

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät der Charité
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Expression und Regulation der MAPK-Phosphatasen im Ovarialkarzinom

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité
Universitätsmedizin Berlin

von

Wolfgang Daniel Schmitt

aus Saarbrücken

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. Steffen Hauptmann

2. Prof. Dr. Sigurd Lax

3. PD Dr. Angela Reles

Datum der Promotion: 14.03.2005

Zusammenfassung:

Phosphorylierung und Dephosphorylierung gehören zu den zentralen Regulationsmechanismen jeder Zelle. Während einer der bekanntesten Signalwege, der Mitogen-aktivierte Protein-Kinase(MAPK)-Signalweg bereits intensiv untersucht wurde, ist über die MAPK-Phosphatasen als wesentliche Inaktivatoren dieser Signalwegfamilie bisher nur wenig bekannt. Die MAPK-Signalwege sind in Tumoren häufig aktiv. Dies ließe sich durch aktivierende Mutationen der Kinasen oder ihrer übergeordneten Rezeptoren erklären. Ein anderer Ansatz geht von der stromalen Entzündungsreaktion aus, die viele solide Tumoren begleitet. Zytokine, die durch die Entzündungszellen gebildet werden, sind physiologische Aktivatoren der MAPK und eine fehlende Gegenregulation durch inaktivierende Phosphatasen würde ebenso zu hoher Aktivität der MAPK führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein solches Entzündungsgeschehen in Ovarialkarzinomzelllinien simuliert und die Reaktion der Phosphatasen MKP-1 und MKP-3 auf proinflammatorische Zytokine untersucht. MKP-1 und MKP-3 reagierten mit erheblichen Unterschieden auf die Zugabe proinflammatorischer Zytokine, das Reaktionsmuster reichte von starker Aktivierung (MKP-1 in SKOV-3 und OVCAR-3) bis hin zu verringerter Aktivität der Phosphatasen (MKP-1 in OAW42 und CAOV-3).

Zur Ergänzung der Zellkulturstudien wurde die Expression der Phosphatase MKP-1 in primären Ovarialkarzinomen, Zystadenomen sowie gesunden Ovarien immunhistochemisch untersucht. Der Proteinnachweis in insgesamt 101 Gewebeproben ergab eine signifikant geringere Expression der Phosphatase MKP-1 in Karzinomen im Vergleich zu normalem Ovarialepithel oder Zystadenomen. Innerhalb der Gruppe der Karzinome zeigte die MKP-1-Expression dennoch eine hohe Varianz, hierbei waren Malignome mit deutlicher MKP-1-Expression mit einer wesentlich schlechteren Prognose der Erkrankung verbunden. Die Phosphatase war in der multivariaten Analyse des rezidivfreien Überlebens ein unabhängiger Prognoseparameter ($RR=4,03$; $95\%CI=1,72-9,48$; $p=0,001$). Ein kürzeres rezidivfreies Überleben ist häufig mit der frühen Entwicklung von Chemoresistenzen verbunden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Phosphatase MKP-1 und Chemoresistenz wurde in Zellkulturversuchen unter Verwendung von Cisplatin, einem wesentlichen Bestandteil der Standardchemotherapie bei Ovarialkarzinomen, untersucht. Die Expression der MKP-1 konnte durch Zugabe von Cisplatin deutlich induziert werden. Bemerkenswerterweise zeigten resistente Zelllinien dabei eine frühe Reaktion, sensible Zellen reagierten deutlich verzögert. Diese frühe Induktion der MKP-1 könnte die therapeutisch induzierte Apoptose blockieren. Weitere Erkenntnisse über die daran beteiligten Signalwege sowie pharmakologische Inhibitoren der Phosphatasen sind daher vielversprechende Ansätze zur Optimierung der Chemotherapie.

Abstract:

Protein phosphorylation and dephosphorylation is a central regulatory system of cells. The mitogen-activated-protein-kinase(MAPK)-pathway as a typical example is one of the most investigated signalling pathways in cancers. In contrast, much less is known about MAPK-phosphatases, their physiological inactivators. MAPK pathways are frequently up-regulated in cancers. This might be explained by activating mutations of kinases or of up-stream receptors. Another view is based on the inflammatory stroma infiltrate that accompanies most solid carcinomas. Cytokines produced by inflammatory cells are physiological activators of MAPK pathways and missing balance of inactivating phosphatases would also result in up-regulated MAPK pathways. In this study, such an inflammatory situation was simulated in cell culture models and expression patterns of MAPK-phosphatases MKP-1 and MKP-3 were investigated after addition of proinflammatory cytokines. The expression of MKP-1 and MKP-3 after cytokine addition differed widely between the ovarian cancer cell lines investigated, ranging from strong induction in SKOV-3 and OVCAR-3 to down-regulation of phosphatases in OAW42 and CAOV-3.

In addition to cell culture experiments, expression of MKP-1 was examined immunohistochemically in primary ovarian cancers, adenomas and normal ovaries (total of 101 samples). There was a lower expression of phosphatase MKP-1 in ovarian cancers compared to surface epithelium of normal ovaries and cystadenomas. However, MKP-1 expression in the group of carcinomas showed a high variation, including also a number of negative cases. Among all investigated cancer samples, those with a higher expression of MKP-1 were associated with poorer prognosis. Multivariate survival analysis revealed this phosphatase as an independent prognostic factor for progression-free survival (RR=4,03; 95%CI=1,72-9,48; p=0,001). Short progression-free survival is usually associated with early development of chemoresistance. Consequently, poor prognosis might result from different efficiencies of initial adjuvant chemotherapeutical treatments. Based on this presumption, the effects of cisplatin, a typically used drug against ovarian cancer, were investigated in cell culture. The phosphatase MKP-1 was highly inducible by cisplatin, remarkably as early reaction in cisplatin-resistant cell lines and with distinct delay in sensitive cells. This early induction of MKP-1 in resistant cells might block drug-induced apoptosis. Further studies about influencing pathways and pharmacological inhibitors of phosphatase MKP-1 might be promising efforts to optimize chemotherapy.

Schlagworte:

MAPK-Signalweg, Phosphatasen, MKP-1, Ovarialkarzinom, Chemotherapie

Keywords:

MAPK-Pathway, phosphatases, MKP-1, ovarian cancer, chemotherapy

FÜR DIE LIEBE

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
1.1	Bedeutung und Hintergründe des Ovarialkarzinoms	4
1.2	Tumor und Entzündung.....	4
1.2.1	Entzündungsmediatoren fördern das Tumorwachstum	5
1.2.2	Therapeutische Beeinflussung des Entzündungsgeschehens.....	6
1.3	Der MAPK-Signalweg	7
1.3.1	ERK-MAP-Kinase	9
1.3.2	p38-MAP-Kinase	9
1.3.3	JNK / SAPK-MAP-Kinase.....	10
1.3.4	Funktionelle Bedeutung des MAPK-Netzwerkes.....	10
1.4	Die Familie der MAPK-Phosphatasen	11
1.4.1	MKP-1 / CL100.....	13
1.4.2	MKP-3 / Pyst-1	14
1.4.3	Weitere Phosphatasen	14
1.4.4	Aktivität und Spezifität gegenüber MAP-Kinasen.....	15
1.4.5	Funktionelle Bedeutung der Phosphatasen.....	16
1.5	Fragestellung	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Material	18
2.1.1	Biologisches Material.....	18
2.1.2	Chemikalien und Enzyme	19
2.1.3	Kits	21
2.1.4	Radiochemikalien.....	21
2.1.5	Oligonukleotide.....	22
2.1.6	Kulturmedien, Lösungen.....	22
2.1.7	Verbrauchsmaterial	24
2.1.8	Geräte.....	24
2.2	Methoden	25
2.2.1	Zellkultur.....	25
2.2.2	Versuchsanordnung.....	26
2.2.3	Western-Blot	26
2.2.4	RT-PCR.....	27
2.2.5	Northern-Blot.....	30
2.2.6	Immunhistologie	35

3	Ergebnisse	37
3.1	Basale MAPK-Phosphatasen-Expression (PCR)	37
3.2	Regulation der Phosphatasen MKP-1 und MKP-3	38
3.2.1	Auswahl der Aktivatoren und Zelllinien	38
3.2.2	Zytokin-induzierte mRNA-Expression (MKP-1)	40
3.2.3	p38-Aktivität im Zeitverlauf (Western-Blot)	46
3.2.4	Untersuchungen der MKP-1 auf Proteinebene	46
3.2.5	Zytokin-induzierte mRNA-Expression (MKP-3)	47
3.3	Suppression der Phosphatasen durch verschiedene Inhibitoren	49
3.3.1	Inhibitoren des MAPK-Signalweges	49
3.3.2	Inhibitoren der atypischen PKC	51
3.3.3	Inhibitoren des PI3K-Signalweges	52
3.4	Expression im Ovarialkarzinom und prognostische Bedeutung	53
3.4.1	Expressionsunterschiede der MKP-1 auf mRNA-Ebene in Tumormaterial	53
3.4.2	Immunhistologische Untersuchungen	54
3.4.3	MKP-1 ist in invasiven Karzinomen geringer exprimiert	55
3.4.4	Univariate Überlebensanalyse	56
3.4.5	Multivariate Überlebensanalyse	58
3.5	Phosphatasen-Induktion durch Cisplatin	60
3.5.1	Induktion der MKP-1 durch Cisplatin in OVCAR-3	60
3.5.2	Induktion der MKP-3 durch Cisplatin in OVCAR-3	61
3.5.3	Verhalten der MKP-1 in einer Cisplatin-resistenten Zelllinie	62
4	Diskussion	63
4.1	MAPK-Phosphatasen sind in verschiedenen Zelllinien nachweisbar	63
4.2	Beeinflussung der Phosphatasenexpression durch Zytokine	63
4.2.1	Induktion der Phosphatase MKP-1	63
4.2.2	komplexe Reaktion der Phosphatase MKP-3	64
4.3	aktivierende Signalwege	65
4.3.1	Einfluß der MAPK-Kaskade	65
4.3.2	Einfluß der Protein Kinase C	67
4.3.3	Bistabilität des MAPK-Signalweges	68
4.4	MKP-1-Expression in primären humanen Ovarialkarzinomen	70
4.4.1	Erhebliche Expressionsunterschiede auf mRNA-Ebene	70
4.4.2	MKP-1 ist in invasiven Karzinomen geringer exprimiert	70

4.5	Korrelation der MKP-1-Expression mit der Prognose	71
4.5.1	Vergleich der MKP-1 mit klinisch-pathologischen Prognosefaktoren.....	71
4.5.2	MKP-1 korreliert mit kürzerem rezidivfreiem Überleben.....	71
4.5.3	MKP-1 ist unabhängiger Prognoseparameter.....	72
4.6	Bedeutung der MKP-1 im Rahmen der Chemotherapie.....	72
4.6.1	Die Bedeutung des MAPK-Signalweges bei der Apoptose	72
4.6.2	Die kritische Rolle der MKP-1 „zwischen Leben und Tod“	73
4.6.3	Verhalten des MAPK-Signalweges unter Chemotherapeutika.....	74
4.7	Ausblick	76
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>		77
<i>Literaturverzeichnis.....</i>		80
<i>Publikationen.....</i>		88
<i>Zeitschriftenbeiträge</i>		88
<i>Kongreßbeiträge</i>		88
	Vorträge	88
	Poster.....	89
<i>Danksagung.....</i>		90
<i>Selbstständigkeitserklärung.....</i>		91
<i>Lebenslauf</i>		92

1 Einleitung

1.1 Bedeutung und Hintergründe des Ovarialkarzinoms

Das Ovarialkarzinom hat einen Anteil von etwa 4 % an den malignen Erkrankungen der Frau mit einem Altersgipfel in der 5. – 6. Lebensdekade. Damit nimmt es die sechste Stelle in der Statistik der malignen Neuerkrankungen bei Frauen in den USA ein.¹ Die anfangs nur milde Symptomatik erklärt die häufig späte Diagnose, bei 60 - 70% der Patientinnen bereits im peritoneal disseminierten Stadium. Entsprechend ist die Prognose, verglichen mit Zervikal- und Endometriumkarzinomen, ungünstiger. Ovarialkarzinome sind die häufigste Todesursache bei malignen Erkrankungen des weiblichen Genitaltrakts² und belegen den fünften Rang aller malignombedingten Todesfälle bei Frauen.¹

Maligne Ovarialtumoren gehen vom Oberflächenepithel des Ovars aus. Abhängig von der Morphologie unterteilt man in seröse (ca. 40 %), muzinöse (ca. 10 %), endometroide (ca. 20 %), undifferenzierte (ca. 10 %) und Klarzellkarzinome (ca. 5 %). Ein weiteres Zehntel verteilt sich auf Tumoren, die aus Keimzellen oder ovariellern Stroma entstanden sind; die übrigen Tumoren sind Metastasen nicht-ovarieller Primärtumoren. Die Abgrenzung von Borderline-Tumoren, die kein destruierend invasives Wachstum aufweisen, ist therapeutisch und prognostisch von großer Bedeutung. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt selbst bei peritoneal disseminierten Borderline-Tumoren bei über 90 %, bei fortgeschrittenen malignen Tumoren lediglich bei ca. 15 %.²

Die heutige Standardtherapie besteht in einer möglichst radikalen chirurgischen Tumorentfernung und einer sich anschließenden Chemotherapie mit Platinverbindungen und Taxanen.³

1.2 Tumor und Entzündung

Bereits 1863 vermutete Rudolf Virchow einen Zusammenhang zwischen Tumoren und Entzündungsgeschehen, sah sogar die Entzündung als Ursache der Entartung an.⁴ Später wurde das inflammatorische Geschehen in der Umgebung von Malignomen lange Zeit als Abwehrreaktion des Körpers gedeutet. Mit den zunehmenden Erkenntnissen über die Entstehung von Tumoren wird jedoch Virchows Hypothese wieder gestützt. Vielfach ist ein erhöhtes Tumorrisiko mit chronischer Entzündung assoziiert, sei es aufgrund viraler, autoimmuner oder

anderer Ätiologie. Darüber hinaus fördert das komplexe malignominduzierte Entzündungsgeschehen sowohl Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung als auch die systemische Immunsuppression.^{5,6} Die hierbei ablaufenden Umbauvorgänge des Tumorstromas wurden sehr treffend mit einer modifizierten Wundheilung verglichen.⁷ Durch tumoreigene Produktion von Mediatoren werden diese normalerweise limitierten Vorgänge aufrecht erhalten, es resultiert ein kontinuierlicher Stromaaufbau als Basis für weiteres Tumorwachstum.

Eine Verbindung zwischen Entartung und vorangegangener Entzündung findet sich beim Ovarialkarzinom wieder. Bei den Ovarien bestehen als Besonderheit die regelmäßig wiederkehrenden Ovulationen, die jeweils eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Eine Theorie zur Ätiologie des Ovarialkarzinoms geht von pathologischen Reparaturprozessen im Rahmen dieser und weiterer lokaler Entzündungen aus.^{2,8} Die Theorie steht im Einklang mit dem Risikofaktor der langen Reproduktionsphase und der Risikominderung durch Schwangerschaften. Auch Asbest oder Talkum verursachen eine lokale Entzündung, wenn sie durch den Genitaltrakt aufgestiegen sind. Dieser Weg ist nach einer Hysterektomie oder einer bilateralen Tubenligation versperrt. Somit lassen sich auch der Risikofaktor Asbest sowie die risikomindernden Effekte der genannten operativen Eingriffe zufriedenstellend erklären. Bisherige Studien mit entzündungshemmenden Medikamenten erreichten jedoch aufgrund zu geringer Fallzahl keine Signifikanz.⁸

1.2.1 Entzündungsmediatoren fördern das Tumorwachstum

Tumorzellen sind in der Lage, proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise IL-1 β , IL-6 und TNF α zu sezernieren. Diese werden auch durch die häufig in Tumorgewebe anzutreffende Hypoxie induziert. Der durch diese Zytokine induzierte Umbau des Stromas verbessert die Bedingungen für den Tumor, beispielsweise wird die Expression von angiogenen Faktoren wie VEGF stimuliert und somit die Blutversorgung verbessert.^{5,6} Außerdem haben sie das Potential, direkt als Wachstums- und Überlebensfaktoren auf Tumorzellen einzuwirken.⁵

In Ovarialkarzinomen sind IL-1 β und TNF α auch in die Regulation der Matrix-Metalloproteinase MMP-9 involviert. Diese fördert durch die Auflockerung des Stromas die Invasion der Tumorzellen.⁶ Möglicherweise führt TNF α im Ovarialkarzinom auch zur Induktion von NO-Synthasen.^{5,6} Der Tumor profitiert einerseits durch die angiogene Wirkung des NO,

zudem führen Reaktionen der entstehenden Radikale mit der DNA zu genetischer Variabilität.

Auf der Suche nach Ursachen der permanenten Zytokinproduktion fanden sich in Ovarialkarzinomzelllinien Hinweise auf Störungen der regulierenden Signalwege.⁶ So wurde gezeigt, daß verschiedene antiinflammatorische Zytokine nicht mehr in der Lage sind, die Entzündung zu bremsen, teilweise wirken antiinflammatorische Mediatoren sogar stimulierend.⁹

1.2.2 Therapeutische Beeinflussung des Entzündungsgeschehens

Die Wechselwirkungen zwischen Tumor und umgebendem Gewebe, und hier insbesondere die Entzündungsmediatoren und deren Signalwege, sind ein wichtiger Ansatzpunkt zu Verständnis und Beeinflussung malignen Wachstums. Durch blockierende Eingriffe in das vom Tumor dauerhaft aktivierte proinflammatorische Mediatornetzwerk lassen sich therapeutische Effekte erwarten.

Die Beeinflussung des Entzündungsgeschehens bei rheumatoider Arthritis und Morbus Crohn durch TNF α -Antagonisten führte zur Blockade der Zytokin-Produktion, reduzierter Angiogenese sowie verminderter Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen.⁵ Möglicherweise lassen sich diese Effekte auch im Rahmen einer Tumorthherapie therapeutisch nutzen.

Die gezielte Beeinflussung der Signalwege ist aufgrund deren Komplexität wesentlich schwieriger. In vitro konnte in Ovarialkarzinomzelllinien durch Blockade des p38-MAPK-Signalweges die invasionsfördernde Wirkung von Zytokinen unterbunden werden.⁶

Bis zur gezielten therapeutischen Anwendung von spezifischen Signalwegs-Inhibitoren sind jedoch noch erhebliche Erkenntnisgewinne über die beeinflussten Signalkaskaden und der induzierten Wechselwirkungen notwendig. Lediglich bei erheblichen Erfolgen im Tiermodell wäre ein experimenteller Einsatz im Rahmen klinischer Studien bereits denkbar.

1.3 Der MAPK-Signalweg

Eine der bekanntesten Signalweg-Familien ist die Gruppe der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK). Durch diese werden über verschiedene Kaskaden Signale von der Zelloberfläche bis in den Zellkern weitergegeben. Ging man vor wenigen Jahren noch von keiner oder nur geringer Überkreuzung der einzelnen Wege aus¹⁰, so muß man heute von einem Signaltransduktions-Netzwerk sprechen.^{11,12}

Die funktionelle Bedeutung der MAPK ist vielfältig, sie sind beispielsweise an der Kontrolle von Proliferation und Differenzierung beteiligt.^{10,12} Ihr Schwerpunkt liegt jedoch in der Regulation von Entzündungsmediatoren, ein Großteil der Zytokine wird u.a. über MAPK gesteuert.^{13,14,15} Die Aktivität der MAPK selbst kann beispielsweise durch eine Reihe transmembranärer Rezeptoren, Phorbolster oder Hitzeeinwirkung beeinflusst werden.

Die einzelnen Kinasen der Signalkaskade können neben ihrer individuellen Bezeichnung in Gruppen eingeteilt werden.^{10,12} Die Kinasen p42/44MAPK oder ERK1/2, p38MAPK, JNK/SAPK und ERK5, werden allgemein als MAPK bezeichnet, wobei diese Bezeichnung häufig auch für die p42/44MAPK alleine gebraucht wird. Deren Aktivatoren in der Kaskade werden als MAP-Kinase Kinasen (MAP2K oder MKK) bezeichnet, diese Gruppe zeigt noch eine hohe Spezifität für die einzelnen MAPK-Signalwege. Die Aktivatoren der MKK, die zusammenfassend als MAP-Kinase Kinase Kinasen (MAP3K oder MKKK) bezeichnet werden, weisen dagegen häufig ein komplexes Aktivierungsmuster mehrerer Signalkaskaden auf. Deren Aktivatoren wiederum sind als MAP4K oder MKKKK zu bezeichnen, unter diesen finden sich vielfach bereits die auslösenden membranassoziierten Proteine, beispielsweise *ras*, *rac* oder *Cdc42*.¹⁶ In Abbildung 1 ist das komplexe System vereinfacht dargestellt.

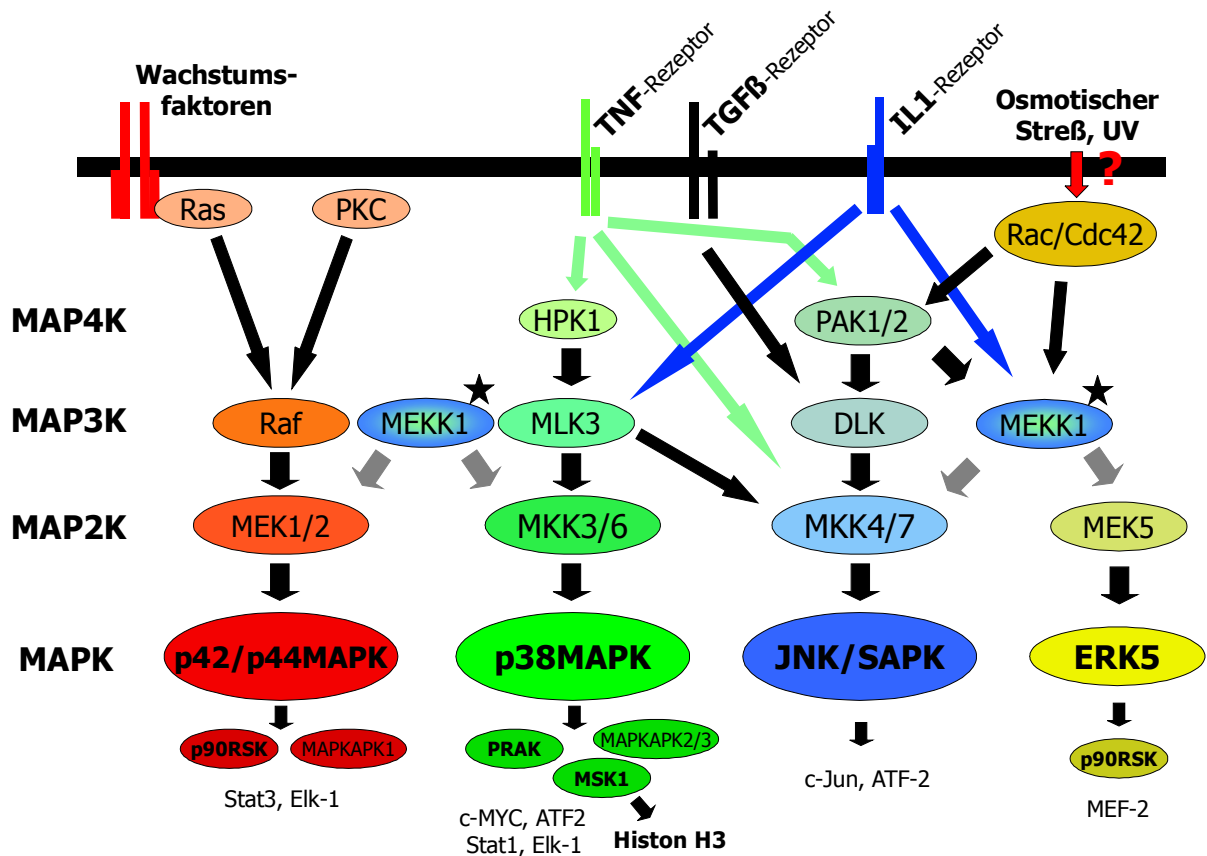


Abbildung 1: MAPK-Signalwege im Überblick^{12,15,16}. Vereinfachte Darstellung. MEKK1 darstellungsbedingt doppelt aufgeführt. Transkriptionsfaktoren: MAPKAPK 5 = PRAK, p90RSK = MAPKAPK 1A

Die Aktivierung der MAP-Kinasen erfolgt durch die Phosphorylierung zweier Aminosäuren, die sich in einem für die jeweilige Gruppe charakteristischen Motiv befinden. Die Spezifität der aktivierenden Proteine wird durch typische Erkennungssequenzen gewährleistet, außerdem stellen auch sog. 'Gerüstmoleküle' (scaffolding proteins) eine räumliche Verknüpfung her.^{12,16} Abbildung 2 zeigt beispielsweise durch JIP-1 (JNK interacting protein-1) verknüpfte Signalmodule.

Die regulierende Inaktivierung der MAP-Kinasen erfolgt durch parallel induzierte MAPK-Phosphatasen (vgl. Kapitel 1.4, S. 11), zudem gibt es Hinweise für einen komplexen Rückkopplungsmechanismus mit Einfluß auf die Rezeptoren.¹²

Die Besonderheiten der einzelnen Kaskaden sowie ihre Funktion sind nachfolgend beschrieben.

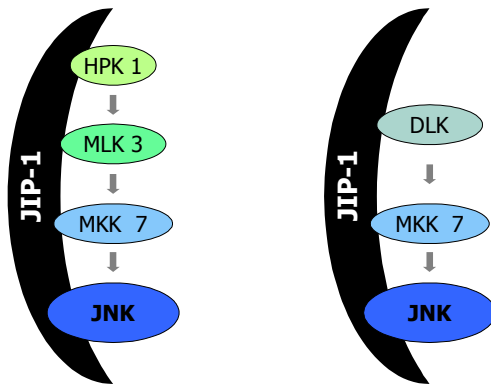


Abbildung 2: funktionelle Signalmodule durch Gerüstmolekül JIP-1^{12,16}

1.3.1 ERK-MAP-Kinase

Der ERK-Signalweg (extracellular-regulated kinases) ist der wohl bestuntersuchte unter den MAP-Kinasen. Die beiden Isoformen ERK1 (p44MAPK) und ERK2 (p42MAPK) werden durch eine Vielzahl von Mitogenen, osmotischen Streß und Zellkontakte sowie durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und im Rahmen viraler Infektionen aktiviert.^{11,17} Der Signalweg beginnt meist mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, zu denen auch das Proto-Oncogen *ras* gehört. Nachfolgend wird das Signal über *raf*-Proteine sowie die MAP-Kinase Kinasen MEK 1 und MEK 2 bis zu den ERK-MAP-Kinasen weitergegeben. Wichtige Funktionen der ERK sind die Beteiligung bei der Regulation von Zellteilung und Proliferation, außerdem tragen sie zu Lernprozessen des Nervensystems bei.^{12,17}

1.3.2 p38-MAP-Kinase

Die p38MAP Kinasen werden durch physikalischen Streß wie osmotische Gradienten und UV-Exposition, aber auch durch Zytokine und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert.¹⁷ Bisher wurden 5 Isoformen der p38 mit unterschiedlicher Gewebeverteilung identifiziert.¹¹ Es gilt als sicher, daß die MKK3 und MKK6 recht spezifisch die p38 aktivieren, eine zusätzliche Aktivierung durch MKK4 ist fraglich. Von der p38-MAPK ist beispielsweise die Produktion der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α und der COX-2 in Monozyten abhängig,¹¹ in Entzündungsgeschehen und Immunantwort wird ihr daher eine Schlüsselrolle zugeschrieben.¹⁷ Neben dieser direkten Zytokinsteuerung sind auch indirekte Wirkungen auf das Entzündungsgeschehen beschrieben worden. So spielt die p38-MAPK eine wesentliche Rolle bei der Regulation der COX-2, durch Interaktion der p38 mit der COX-2-mRNA soll diese

stabilisiert werden, wobei dieser Effekt durch Dexamethason über die nachfolgende Inaktivierung der p38 gehemmt werden kann.¹⁸ Schließlich ist die p38MAPK in die Induktion von Apoptose involviert.¹²

1.3.3 JNK / SAPK-MAP-Kinase

Die Gruppe der JNK (c-Jun amino-terminal kinases) oder p54SAPK (stress-activated protein kinase) setzen sich im wesentlichen aus den ubiquitär exprimierten Kinasen JNK1 und JNK2 sowie der nur in einigen Geweben exprimierten JNK3 zusammen.¹¹ Die Aktivierung erfolgt ähnlich der p38MAPK durch Streß oder Zytokine über mehr als ein Dutzend MAP3K¹⁹ sowie in der nächsten Ebene durch MKK4 und MKK7. Zudem ist auch eine Aktivierung durch *ras* möglich, der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar.²⁰ Es wurde jedoch gezeigt, daß zwei durch p38 induzierte Proteine, MK2 und PRAK, diesen Weg blockieren können. Ihre Wirkung entfalten die JNK-MAP-Kinasen u.a. über *c-Jun* als Bestandteil des AP-1-Komplexes, der ein wichtiger Regulator der Genexpression darstellt.¹⁷ Auf diese Weise haben die JNK Einfluß auf die Expression vieler Zytokine, außerdem sind sie in die Einleitung von Apoptose involviert.¹²

1.3.4 Funktionelle Bedeutung des MAPK-Netzwerkes

Das hochkomplexe Netzwerk der MAP-Kinasen mit seinen kaum überschaubaren Regulationsmechanismen spielt eine große Rolle für das Verständnis und die Therapie vieler Erkrankungen. Beispielsweise wurde die Entwicklung von Melanomen mit Störungen der MAPK-Signalwege in Verbindung gebracht.²¹ Im Vergleich zu benignen Naevi war die MAPK-Aktivität und die VEGF-Produktion in Melanomen erhöht.²² Gut differenzierte Prostatakarzinome wiesen ebenfalls eine erhöhte p38MAPK-Aktivität auf, in späten Stadien waren dagegen die aktivierten ERK-, JNK- und p38-MAPK reduziert oder nicht mehr nachweisbar.²³

Experimentell konnte in Ovarialkarzinomzelllinien durch ATP die MAPK aktiviert und die Proliferation gesteigert werden.²⁴ Diese Effekte waren durch den MEK-Inhibitor PD98059 sowie durch den PKC-Inhibitor Staurosporin vollständig blockierbar. Weiterhin wurde gezeigt, daß in vielen Ovarialkarzinomen der MEK-ERK-Signalweg dauerhaft aktiviert ist.²⁵

Einen wesentlichen, bisher jedoch vergleichsweise wenig erforschten Anteil an der Regulation der MAP-Kinasen hat die Gruppe der MAPK-Phosphatasen, die nachfolgend beschrieben sind.

1.4 Die Familie der MAPK-Phosphatasen

Die Inaktivierung der MAP-Kinasen erfolgt durch die Gruppe der MAPK-Phosphatasen, die auch als Dual-spezifische Phosphatasen bezeichnet werden. Die ersten Beschreibungen einer solchen erfolgten 1992 durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen^{26,27}. Aufgrund der Aktivierung durch viele MAPK-Stimuli lag die Vermutung nahe, daß es sich um einen Feedback-Mechanismus der MAP-Kinasen handelt.²⁸

Die MAPK-Phosphatasen sind auf verschiedenen Genen unabhängig voneinander kodiert. Neben der strengen Konservierung eines gemeinsamen Motivs im Bereich des aktiven Zentrums unterscheiden sich die einzelnen Phosphatasen jedoch in der übrigen Sequenz und in ihren Spezifitäten gegenüber den MAP-Kinasen, so daß gezielt einzelne Signalwege inaktiviert werden können. Ging man ursprünglich davon aus, daß die Wirkung der Phosphatasen auf den Zellkern begrenzt ist, so mußte mit der Entdeckung der Phosphatasen MKP-3, M3/6 und MKP-4 im Zellplasma das Spezifitätsmuster um die Lokalisation ergänzt werden.²⁸

Obwohl die MAPK-Phosphatasen in engem Zusammenhang mit den MAP-Kinasen reguliert werden, ist über die Einzelheiten der Phosphatasen-Regulation bisher vergleichsweise wenig bekannt. Anfangs wurde vermutet, daß die Phosphatasen unmittelbar durch die MAP-Kinasen aktiviert werden. Die ERK-Aktivierung reicht jedoch nicht immer zur Aktivierung der MAPK-Phosphatase MKP-1 aus.²⁹ Desweiteren führen bestimmte Aktivatoren der Protein Kinasen A und C zu einer MKP-1-Expression, ohne die MAPK-Signalwege zu beeinflussen.³⁰ Schließlich gibt es Hinweise, daß die Regulation der MAP-Kinasen nicht unbedingt linear verlaufen muß. So wurde mit Hilfe eines Simulationssystems eine bistabile Regulation von MAP-Kinasen durch die Phosphatase MKP-1 prognostiziert.³¹

Bisher wurde mehr als ein Dutzend MAPK-Phosphatasen beschrieben. Die häufig zeitgleichen Erstbeschreibungen in teilweise unterschiedlichen Spezies führten zu einer Reihe von synonym verwendeten Bezeichnungen. Um den Umgang mit der weiterhin wachsenden Phosphatasen-Familie zu strukturieren, wurde die Bezeichnung 'DUSP' für 'dual-spezifische Phosphatase' eingeführt, die jedoch noch nicht in allen Publikationen übernommen wird. Tabelle 1 zeigt die wichtigsten Vertreter mit ihren alternativen Bezeichnungen sowie ihren Genlokalisierung:

Tabelle 1: MAPK-Phosphatasen

systematische Bezeichnung	weitere Bezeichnungen	Genlokalisierung
DUSP1	MKP-1 ^{32,33} CL100 ^{26,34} 3CH134 ²⁷	5q34 ³⁵
DUSP2	PAC-1 ³⁶	2q11 ³⁷
DUSP3	VHR ³⁸	17q21 ³⁹
DUSP4	MKP-2 ⁴⁰ hVH-2 ⁴¹ TYP-1 ⁴²	8p12-p11 ⁴³
DUSP5	hVH3 ³⁷ B23 ⁴⁴	10q25 ³⁷
DUSP6	MKP-3 ^{45,46} Pyst-1 ⁴⁷	12q21-q23 ^{43,48}
DUSP7	Pyst2 ⁴⁷ MKP-X ⁴⁵	3p21 ⁴³
DUSP8	M3/6 ⁴⁶ hVH-5 ⁴⁹	11p15.5 ⁵⁰
DUSP9	MKP-4 ⁵¹	Xq28 ⁵¹
DUSP10	MKP-5 ⁵²	1q41 ⁵³

Unter Berücksichtigung der Aminosäuresequenzen lassen sich die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Phosphatasen erkennen. So zeigte sich eine hohe Übereinstimmung zwischen DUSP1 und DUSP4 sowie zwischen DUSP6 und DUSP7, wohingegen diese beiden Gruppen zueinander sowie jeweils zu den Phosphatasen DUSP2 und DUSP5 phylogenetisch weiter entfernt sind.⁴⁷

1.4.1 MKP-1 / CL100

1.4.1.1 Komplexe Induzierbarkeit

Die erstbeschriebene Phosphatase MKP-1 kann u.a. durch Hitzeschock oder Wasserstoffperoxid induziert werden,²⁶ die Untersuchung möglicher Aktivatoren der MKP-1 wurde bereits mit Hilfe verschiedener Inhibitoren durchgeführt. Dabei konnte durch den MEK-Inhibitor U0126 eine Aktivierung verhindert werden, jedoch nicht durch den p38-MAPK-Inhibitor SB203580.⁵⁴

Weiterhin führte Arsenit zur MKP-1-Aktivierung. Hierbei wurde eine um das 3-fache gesteigerte Phospho- und Acetylierung des Histons H3 am MKP-1-Chromatin als mögliches Steuerungselement beobachtet.⁵⁴ Sowohl MKP-1-Induktion als auch die Histon-Veränderungen ließen sich im Gegensatz zur vorbeschriebenen Induktion durch den p38-MAPK-Inhibitor SB203580 signifikant reduzieren, der Zugabe des MEK-Inhibitors U0126 folgte jedoch keine Reduktion.⁵⁴

Durch Dexamethason wird über einen Glukokortikoid-Rezeptor die Transkription der MKP-1 gesteigert und deren Degradation reduziert. Die Stabilisierung der mRNA soll hierbei durch die p38-MAPK erfolgen.⁵⁵ Als Folge der ausgelösten MAPK-Inaktivierung werden die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α gehemmt.⁵⁶ Diese antiinflammatorische Wirkung der MKP-1 durch Dexamethason wurde bisher für keine weitere Phosphatase gezeigt.⁵⁵

Aus der Vielfältigkeit der möglichen Aktivierungswege resultiert eine komplexe Reaktion auf eine Vielzahl von Zytokinen und weiterer Mediatoren.

1.4.1.2 Spezifität und intrazelluläre Lokalisation

Zunächst wurde eine hohe Aktivität der MKP-1 gegenüber ERK gezeigt.^{27,32,34} Später wurde auch die Inaktivierung von JNK und p38 MAPK nachgewiesen,^{57,58} aktuellere Daten gehen von einer etwa gleichmäßigen Aktivität gegenüber allen MAP-Kinasen^{30,59} aus.

Der Nachweis des Proteins gelang in einer Vielzahl von Geweben u.a. in Herz, Lunge, Leber, Pankreas, Skelettmuskel und Plazenta.³⁴ Intrazellulär wurde die MKP-1-Expression zunächst im Kern beschrieben.^{28,59}

1.4.1.3 Regulation

Die Regulation der MKP-1 erfolgt im wesentlichen auf Transkriptionsebene.⁶⁰ Die mRNA wird bereits nach kurzer Zeit abgebaut, als Halbwertszeit werden etwa 20 min angenommen.⁵⁷ Die Protein-Halbwertszeit beträgt etwa 40 min.²⁷

Zwiespältig sind die Angaben zur Beeinflussung durch die ERK-Kinase: Einerseits soll durch ERK-bedingte MKP-1-Phosphorylierung eine erhöhte Stabilität entstehen,⁶¹ andererseits kann die ERK den MKP-1-Abbau über den Ubiquitin-Proteasom-Weg triggern.⁶²

1.4.2 MKP-3 / Pyst-1

Neben der MKP-1 als bisher bestuntersuchter MAPK-Phosphatase ist eine Vielzahl weiterer Phosphatasen beschrieben worden. Über diese ist allerdings bisher im Vergleich zur MKP-1 nur wenig bekannt. Eine grobe Darstellung der unterschiedlichen Aktivität gegenüber den MAP-Kinasen und ihrer intrazellulären Lokalisation findet sich in Abbildung 3.

Besondere Aufmerksamkeit verdienen die wenigen Phosphatasen, die im Zytoplasma lokalisiert sind, da sie auf eine unabhängige Regulation der MAPK-Aktivität in Zellkern und Zytoplasma hinweisen. Zu diesen gehört die MKP-3, die erstmals 1996 beschrieben wurde.⁴⁵ Ihre Aktivität gilt in erster Linie den ERK-Kinasen, JNK und p38 werden nur teilweise inaktiviert.^{46,47} Obwohl die Phosphatase MKP-3 bereits eine konstitutive Expression aufweist⁴⁷, kann sie beispielsweise durch NGF (nerve growth factor) induziert werden.⁴⁵ Durch Dexamethason ist ebenfalls eine geringe Induktion beschrieben, auffällig ist dabei jedoch eine darauf folgende Reduktion der MKP-3 auf ein Zehntel des Ausgangswertes.⁶³

1.4.3 Weitere Phosphatasen

Die Phosphatase M3/6 ist wie die MKP-3 im Zytoplasma anzutreffen.⁴⁶ Sie weist jedoch keine Aktivität gegenüber den ERK-Kinasen auf,²⁸ sondern inaktiviert selektiv JNK und p38. Daher wurde vermutet, daß diese beiden sich ergänzenden Phosphatasen die unterschiedlichen Signalwege im Zytoplasma als Gegenspieler kontrollieren.⁵⁹

Die ebenfalls im Zytoplasma lokalisierte Phosphatase MKP-4 ist auf wenige Gewebe begrenzt (Plazenta, Niere, embryonale Leber)⁵¹ und dürfte hier die MKP-3 mit vergleichbarer Spezifität funktionell ergänzen.

Die 1999 beschriebene Phosphatase MKP-5 ist in vielen Geweben (u.a. Herz, Lunge, Leber, Niere, Skelettmuskel) zu finden. Ihr Aktivität in Zytoplasma und Zellkern konzentriert sich auf die p38- und JNK-Kinase.⁵²

Die Phosphatase MKP-2 präsentiert sich wie die nah verwandte MKP-1 im Zellkern. Sie inaktiviert mit hoher Spezifität die ERK-Kinasen,⁴¹ zu denen auch eine Co-Lokalisation besteht.⁴⁰ Zudem zeigt sie eine geringe Aktivität gegenüber JNK und p38.²⁸ Die Induktion der MKP-2 findet über ERK und JNK statt.^{30,64}

1.4.4 Aktivität und Spezifität gegenüber MAP-Kinasen

Die verschiedenen Phosphatasen können unter optimalen Bedingungen häufig alle MAP-Kinasen dephosphorylieren. Unter physiologischen Bedingungen ist ihre Aktivität jedoch meist auf bestimmte Kinasen begrenzt.²⁸ Eine orientierende Übersicht der Phosphatasen-Spezifität findet sich in der nachfolgenden Abbildung 3:

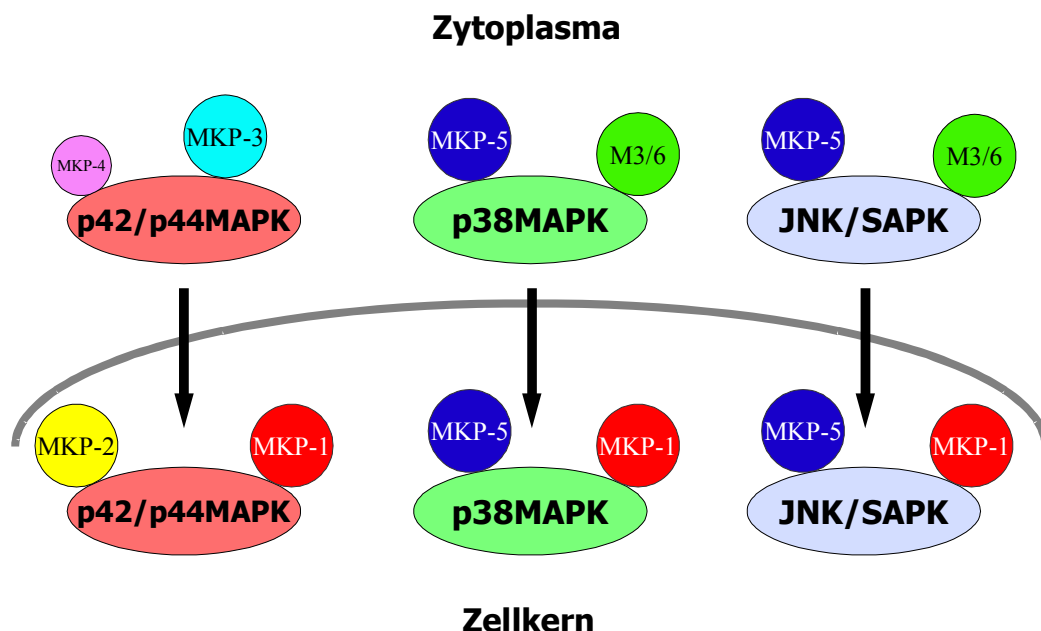


Abbildung 3: MAPK-Phosphatasen-Spezifität

1.4.5 Funktionelle Bedeutung der Phosphatasen

Die Funktion der MAPK-Phosphatasen ist nach heutigem Kenntnisstand auf die Inaktivierung der MAP-Kinasen beschränkt. Daher stimmt die funktionelle Bedeutung der Phosphatasen zu großen Teilen mit denen der Kinasen überein (vgl. Kap. 1.3.4, S. 10).

Die Phosphatasen-vermittelten Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Signalwegen machen jedoch erst die gesamte Komplexität des Netzwerks deutlich. Die durchaus gängige Praxis, verschiedene MAPK-Wege getrennt zu betrachten, muß somit hinterfragt werden.

Möglicherweise lassen sich viele Effekte, die bisher durch Störungen der MAPK-aktivierenden Kaskaden nicht ausreichend erklärbar waren, mit Dysregulationen im größtenteils noch unbekannten Aktivierungsmechanismus der Phosphatasen begründen.

Beispielsweise ist die zuvor beschriebene erhöhte MAPK-Aktivität in Melanomen vermutlich durch eine niedrige MKP-1-Expression bedingt.⁶⁵

Weiterhin scheint in frühen Stadien von Prostatakarzinomen eine erhöhte MKP-1-Expression durch Beeinflussung des JNK-Signalweges Apoptose zu verhindern⁶⁶ und könnte somit erst das Fortschreiten bis zu späten Stadien mit reduzierter oder nicht mehr nachweisbarer MAPK-Aktivität²³ ermöglichen.

1.5 Fragestellung

In dieser Arbeit sollten die MAPK-Phosphatasen in Ovarialkarzinomen mit folgenden Fragestellungen untersucht werden:

- Welche Phosphatasen werden in Ovarialkarzinomzelllinien basal exprimiert ?
- Sind die Phosphatasen durch Zytokine induzierbar ?
- Korreliert die Phosphatasenexpression mit der Aktivität ihrer Zielproteine ?
- Über welche Signalwege werden die Phosphatasen aktiviert ?

Speziell zur MKP-1:

- Wie verteilt sich die Expression der Phosphatase MKP-1 in Ovarialkarzinomen ?
- Besteht eine Korrelation zwischen MKP-1-Level und Klassifizierung, Stadium oder Grading dieser Tumoren ?
- Läßt sich aus der MKP-1-Expression eine Verlaufssprognose ableiten ?
- Wie reagiert die Phosphatase MKP-1 unter dem Einfluß des Chemotherapeutikums Cisplatin ?
- Verändert sich dieses Verhalten der MKP-1 bei Chemoresistenz ?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material

2.1.1.1 *Humane Zelllinien*

SKOV-3 (ATCC# HTB-77)	Seröses Karzinom des Ovars	Cell Lines Service, Heidelberg
OVCAR-3 (ATCC# HTB-161)	Seröses Karzinom des Ovars	Cell Lines Service, Heidelberg
OAW42	Seröses Karzinom des Ovars	Cell Lines Service, Heidelberg
CAOV-3 (ATCC# HTB-75)	Seröses Karzinom des Ovars	WAK Chemie Medical GmbH, Bad Soden
A27/80	Seröses Karzinom des Ovars	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, England
A27/80cis	A27/80 Cisplatin-resistent	PD Dr. H. Lage, Berlin
ES-2 (ATCC# CRL-1978)	Klarzellkarzinom des Ovars	WAK Chemie Medical GmbH, Bad Soden
MDAH 2774 (ATCC# CRL-10303)	Seröses Karzinom des Ovars	WAK Chemie Medical GmbH, Bad Soden
PA-1 (ATCC# CRL-1572)	Teratokarzinom des Ovars	Cell Lines Service, Heidelberg
HOSE	Oberflächenepithel des Ovars, durch HPV- Transfektion immortalisiert	Dr. S.W. Tsao, Hong Kong, VR China ⁶⁷

2.1.1.2 *Plasmide in E. coli*

I.M.A.G.E.-Consortium cDNA Clones ⁶⁸ lt. Tabelle 2, Vektor pT7T3D-Pac mod1	Resource Center of the German Human Genome Project Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin IMAGE Consortium Homepage: http://image.llnl.gov
---	---

Tabelle 2: IMAGE-Klone

Clone ID IMAGE-Consortium	IMAGE ID	enthaltene Phosphatase
IMAGp998P205928Q2	2387203	DUSP1
IMAGp998D031197Q2	501842	DUSP6

Die Auswahl der Klone erfolgte unter Nutzung der Internetressourcen GenBank, UniGene und BLAST des National Center for Biotechnology Information der National Library of Medicine der National Institutes of Health, Bethesda, USA.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Acrylamid	Appligene, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
AmpliTaQ DNA Polymerase 5U/μl, cat# N801-0060	Perkin Elmer, Branchburg, USA
Aquatex	Merck, Darmstadt
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Hefeextrakt, cat# 0127.17	Falcon-Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich
Bacto Trypton, cat# 0123-17	Falcon-Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
CDP-Star	Tropix, Bedford, USA
2'-Desoxyribonucleosid-5'- Triphosphate (dNTP's), je 2,5mM	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DNA-Längenstandard 100bp, cat# 15628-050	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), cat# BE12-707F	Bio Whittaker, Verviers, Niederlande
Essigsäure	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	ICN Biomedicals Inc, Aurora, USA

Ethylendiamintetraessigsäure- di-Natriumsalz (EDTA)	Merck, Darmstadt
ExpressHyb Hybridization Solution, cat# 8015-2	Clontech, Palo Alto, USA
Fast Red TR/Naphthol AS-MX	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Foetales Kälberserum (FCS), cat# 3402-P992203	PAN Biotech, Aidenbach
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Bio Whittaker, Verviers, Niederlande
Glycerol anhydrous	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Glycin	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
I-Block	Tropix, Bedford, USA
p38-Inhibitor SB203580, cat# 270-179-M001	Alexis Biochemicals, Grünberg
<i>raf</i> ⁻ MKK1-Inhibitor PD 98059, cat# 385-023-M005	Alexis Biochemicals, Grünberg
p13-Kinase-Inhibitor LY 294002, cat# 270-038-M001	Alexis Biochemicals, Grünberg
PKC-Inhibitor Ro-31-8220, cat#557520	Calbiochem, San Diego, USA
PKC-Inhibitor GF109203X, cat#203290	Calbiochem, San Diego, USA
Interleukin 1 β (IL-1 β), rekombinant, human, cat# 201-LB	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin 6 (IL-6), rekombinant, human, cat# 1138600	R&D Systems, Wiesbaden
Low-Melting-Agarose	FMC Bioproducts, Maine, USA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ • 6 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
MCDB 105 Medium, cat# M-6395	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Medium 199, cat# M-2154	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
MKP-1-Antikörper, cat# M-3787	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
MMLV Reverse Transkriptase, 200 U/ μ l	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	ICN, Aurora, USA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
10 x PCR-Puffer, 15mM MgCl ₂ , cat# N808-0006	Perkin Elmer, Branchburg, USA
Random Hexamere, cat# C1181	Promega, Madison, USA
Rnasin, 40 U/ μ l, cat#N251B	Promega, Madison, USA
Salzsäure	Merck, Darmstadt

Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris(Hydroxymethyl)- aminomethan (Tris-Base)	Merck, Darmstadt
Tris(Hydroxymethyl)- aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Merck, Darmstadt
Trypsin / EDTA-Lösung 0,5% / 0,2% (w/v) in PBS (10-fach konzentriert)	Biochrom KG, Berlin
Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), cat# 210-TA	R&D Systems, Wiesbaden
Tween 20	Serva, Heidelberg
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

2.1.3 Kits

BCA Protein Assay Reagent	Pierce, Rockford, USA
Megaprime DNA Labelling System	Amersham Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, England
Mini Prep Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Midi Kit	Qiagen, Hilden
Super Sensitive Detection Kit	BioGenex, San Ramon, USA

2.1.4 Radiochemikalien

$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP 3000 Ci/mmol	ICN Biochemicals, Eschwege
--	----------------------------

2.1.5 Oligonukleotide

human G3PDH cDNA
control probe, cat# 9805-1

Clontech, Palo Alto, USA

Primer lt. Tabelle 3

BioTez, Berlin

Tabelle 3: Primer

Bezeichnung	Sequenz	Länge des PCR-Produktes
GAPDH fwd	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'	452 bp
GAPDH rev	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'	
DUSP1 fwd	5'-CCG CGC AAG TCT TCT TCC TC-3'	383 bp
DUSP1 rev	5'-GTC AAT GGC CTC GTT GAA CC-3'	
DUSP4 fwd	5'-GTT AAG CAG CGC CGC AGC AT-3'	409 bp (Var. 1)
DUSP4 rev	5'-TTC TGG CTG GCC TCG TCG TT-3'	410 bp (Var. 2)
DUSP5 fwd	5'-AAG GAA GGC CAA GCC ATT AC-3'	514 bp
DUSP5 rev	5'-CTG AGA AGA GGT GGA ATG AG-3'	
DUSP6 fwd	5'-GAG GCC TTA TGC AGA AGC TC-3'	524 bp
DUSP6 rev	5'-CTA TGC GCT TGG AAG TCC TC-3'	
DUSP9 fwd	5'-AGC CGC GAG CTG TAC GAG TC-3'	449 bp
DUSP9 rev	5'-GCC TCG GAT TCC GCA TCA GA-3'	
DUSP10 fwd	5'-GCT GAA GAG GAG CGC CAG AT-3'	415 bp
DUSP10 rev	5'-GAG GTT CCG ATG GCA GTG GT-3'	

Die Auswahl der Primersequenzen erfolgte mit Hilfe der Software Primer Designer V3.0 (Scientific & Educational Software).

2.1.6 Kulturmedien, Lösungen

DMEM, serumhaltig: 500 ml DMEM
10 ml L-Glutamin
50 ml FCS

DMEM, serumfrei: 500 ml DMEM
10 ml L-Glutamin

LB-Medium: 10 g Bacto Trypton
5 g Bacto Hefe Extrakt
10 g Natriumchlorid
pH 7,0 einstellen
ad 1000 ml H₂O

LB-Medium mit Agar: 1000 ml LB-Medium
15 g Bacto Agar

10 x PBS:	82,3	g	Di-Natriumhydrogenphosphat				
	23,5	g	Natrium-di-hydrogenphosphat				
	40,0	g	Natriumchlorid				
	ad 1000	ml	H ₂ O				
			pH 7,2 einstellen				
Tris-HCl 0,5M:	30,25	g	Tris-Base	Tris-HCl 1,5M:	90,75	g	Tris-Base
	ad 500	ml	H ₂ O		ad 500	ml	H ₂ O
			pH 6,8 einstellen				pH 8,8 einstellen
Tris-HCl 1,0M:	60,50	g	Tris-Base	TE:	1,0	ml	1M TrisHCl
	ad 500	ml	H ₂ O		0,2	ml	0,5M EDTA
			pH 8,0 einstellen		ad 100	ml	H ₂ O
50 x TAE:	242,0	g	Tris-Base	25 x MOPS:	20,5	g	Natriumacetat
	57,1	ml	Essigsäure		7,3	g	EDTA
	100,0	ml	EDTA 0,5M		209,3	g	MOPS
	ad 1000	ml	H ₂ O		ad 1000	ml	H ₂ O
			pH 7,5 – 7,8 einstellen				pH 7,0 einstellen
			autoklavieren				
20 x SSC:	220,0	g	Tri-Natriumcitrat-dihydrat	DNA-Auftragspuffer:	4,0	g	Sucrose
	337,5	g	Natriumchlorid		2,5	mg	Bromphenolblau
	ad 2500	ml	H ₂ O		10	ml	TE
RNA-Auftragspuffer:	300,0	µl	deionisiertes Formamid				
	22,5	µl	25 x MOPS				
	105,0	µl	Formaldehyd				
	3,0	µl	Ethidiumbromid				
	1	Krüm	Bromphenolblau				
	40,0	µl	Glycerin				
Waschpuffer 1: (Northern Blot)	1,0	g	SDS	Waschpuffer 2: (Northern Blot)	1,0	g	SDS
	100,0	ml	20 x SSC		5,0	ml	20 x SSC
	ad 1000	ml	H ₂ O		ad 1000	ml	H ₂ O
Protein-Lysispuffer:	1,2	ml	0,5M Tris-HCl	Western-Blot-Elektrophoresespuffer	30,3	g	Tris-Base
	2,0	ml	10% SDS		144,0	g	Glycin
	1,0	ml	Glycerol		2,8	g	SDS
	0,5	ml	DTT		ad 1000	ml	H ₂ O
	5,3	ml	H ₂ O				pH 8,3-8,4 einstellen
WB-Sammelgel (4%)	3,20	ml	H ₂ O	WB-Trenngel (12%)	3,2	ml	H ₂ O
	0,50	ml	Acrylamid		3,0	ml	Acrylamid
	1,25	ml	0,5M Tris-HCl		2,5	ml	1,5M Tris-HCl
	50	µl	10% SDS		100	µl	10% SDS
	50	µl	10% APS		50	µl	10% APS
	10	µl	TEMED		5	µl	TEMED
WB-Blocking-Puffer	300	ml	1 x PBS	10 x WB-Transferpuffer	58,0	g	Tris-Base
	0,6	g	I-Block	(nach Verdünnung	29,0	g	Glycin
			auf ca. 80°C erhitzen	20 Vol% Methanol	3,7	g	SDS
	300	µl	Tween 20	frisch zugeben)			pH 8,3 einstellen
					ad 800	ml	H ₂ O

Waschpuffer
(Western Blot)

50 ml 10 x PBS
0,5 ml Tween 20
ad 500 ml H₂O

**10 x WB-
Assay-Puffer**

24,2 g Tris-Base
2,033 g MgCl₂ • 6 H₂O
ad 1000 ml H₂O
pH 9,8 einstellen

**Immunhistologie –
Citratpuffer**

3,78 g Zitronensäure
24,21 g Tri-Natriumcitrat-
Dihydrat
ad 1000 ml H₂O
pH 6,0 einstellen

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Chromatographiepapier

Whatman, Maidstone, England

3MM CHR

Deckgläser

Menzel-Gläser, Braunschweig

Filter

Schleicher & Schuell, Dassel

Hyperfilm ECL

Amersham Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, England

Microtest Zellkulturplatten 96 well

Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

Objektträger SuperFrostPlus

Menzel-Gläser, Braunschweig

Parafilm

American National Can, Menasha, USA

Petrischalen für Bakterien

Falcon-Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich

Petrischalen für Zellkultur

Falcon-Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich

Protein-Transfermembran Protran

Schleicher & Schüll, Dassel

BA83 0,2 µm

RNA-Transfermembran Hybond N+

Amersham Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, England

Röntgenfilme Biomax MS

Eastman Kodak, Rochester, USA

Serologische Pipetten

Falcon-Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich

Zellkulturflaschen 75 cm²

Falcon-Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich

Zellschaber

Costar, Corning, USA

2.1.8 Geräte

Abzug

Captair, Düsseldorf

Bakterienwerkbank

Clean Air, Göttingen

Dampfsterilisator Varioclav

H+P Labortechnik, München

Dampfsterilisator

Tecnomara, Fernwald-Steinbach

Technoclav 50 (für Bakterien)

Densitometer GS 670

Bio-Rad, München

Elektrophoresekammern Agagel

Biometra, Göttingen

Maxi und Mini

Elektrophoresenetzgerät

Savant Instruments, Holbrook, USA

Savant PS250

ELISA-Reader

Bio-Tek Instruments, Winooski, USA

Filmentwickler Hyperprocessor

Amersham Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, England

Geldokumentationsanlage

MWG Biotech, Ebersberg

Heizblock 100°C

Roth, Karlsruhe

Hybridisierungsöfen

Hybaid, Heidelberg

Hybridisierungsröhrchen	Biometra, Göttingen
Magnetrührer Variomag	H+P Labortechnik, München
pH-Meter	Mettler, Schwerzenbach, Schweiz
Photometer GeneQuant II	Amersham Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, England
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Schüttelinkubator 3032	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Schüttler	Biometra, Göttingen
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Trio-Thermoblock	
Thermomixer	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
UV-Crosslinker	Hoefer, San Francisco, USA
UV-Transilluminatoren	MWG Biotech, Ebersberg
	Biometra, Göttingen
	Eastman Kodak, Rochester, USA
Verstärkungsfolie für Röntgenfilme	
Biomax MS	
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Zellkulturmikroskop IMT-2	Olympus Optical, Hamburg
Zellkulturbrutschrank BB 16	Heraeus, Hanau
Zellkulturwerkbank	Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3, OVCAR-3, OAW42 und CAO-3 wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% FCS kultiviert. Für die Oberflächenepithelzelllinie HOSE wurde MCDB 105 Medium und Medium 199 zu gleichen Teilen mit 15%igem FCS-Zusatz verwendet. Die Inkubation im Zellkulturschrank erfolgte in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und einem 5%igen Volumenanteil CO₂.

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank unter Verwendung steriler Materialien und Lösungen. Die Trypsin-Lösung wurde zusätzlich bei der Zugabe filtriert.

Der Austausch des Kulturmediums erfolgte alle 3-4 Tage. Bei ca. 80%iger Konfluenz wurden die Zellen wie folgt passagiert: Zunächst wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Trypsin gespült. Nach erneuter Absaugung wurde 1 ml frisches Trypsin über den gesamten Flaschenboden verteilt. Im Anschluß erfolgte die Inkubation bei 37°C, bis sich unter mikroskopischer Kontrolle alle Zellen vom Untergrund gelöst und vereinzelt hatten. Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von 9 ml Medium gestoppt. Von der resultierenden Zellsuspension wurden abhängig von Zelllinie 0,25 ml bis 5 ml in der Kulturflasche belassen und diese mit Medium auf 10 ml aufgefüllt.

2.2.2 Versuchsanordnung

Die aus der Passagierung zur Verfügung stehende Zellsuspension wurde je nach Bedarf mit Medium verdünnt und gleichmäßig in Petrischalen ausgesät. Nach der Ergänzung von Medium auf ein Volumen von jeweils 4 ml folgte die Inkubation im Brutschrank für 2-3 Tage. Nach dem Erreichen von mind. 70%iger Konfluenz wurde das Medium durch 4 ml serumfreies Medium ausgetauscht.

Am folgenden Tag erfolgte die Stimulation mit Zytokinen, TPA oder Cisplatin. Hierbei wurde für jeden Zeitpunkt eine bis auf die Stimulantienzugabe gleich behandelte Kontrolle, sowie pro Versuchsreihe eine zum Zeitpunkt 0 geerntete Kontrolle mitgeführt.

Sofern bei Versuchen Inhibitoren verwendet wurden, erfolgte deren Zugabe 30 min vor der Zytokinstimulation; den Kontrollen wurden gleiche Volumina des Inhibitor-Lösungsmittels DMSO zugesetzt.

2.2.3 Western-Blot

2.2.3.1 Protein-Isolierung

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit erfolgte die Zell-Lyse durch Zugabe von 100 µl des Protein-Lysis-Puffers pro Petrischale. Einer 5-minütigen Inkubationszeit auf Eis folgte die mechanische Ablösung mit Hilfe eines Zellschabers und die Überführung in Eppendorfgefäße. Durch mehrmaliges Aufziehen in eine Insulinspritze (0,45 mm-Kanüle) wurde die Homogenisierung abgeschlossen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.3.2 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Protein-Konzentrationen erfolgte mit dem BCA Protein Determination Kit nach Pierce. Hierbei wird Cu^{2+} durch die Proteine reduziert, die reduzierten Cu^{+} -Ionen bilden mit Bicinchoninsäure einen farbigen Komplex, dessen Farbintensität als Maß des Reaktionsumfangs in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 562 nm quantifiziert wurde. Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers, die Inkubationszeit betrug 1 h. Mit Hilfe einer unter gleichen Bedingungen mitgeführten Protein-Standardreihe konnten die Protein-Konzentrationen berechnet werden.

2.2.3.3 Elektrophorese und Transfer

Die Elektrophorese wurde als SDS-PAGE unter Verwendung eines 4%igen Sammel- und 12%igen Trenngels durchgeführt. Die Angleichung des Proteingehalts der einzelnen Proben geschah zuvor durch Zugabe von Lysispuffer. Weiterhin erfolgte eine 5-minütige Lyse bei 95°C. Die Auftrennung der Proben und eines Längenmarkers verlief über 30 min bei 30 V und anschließend über 90 min bei 100 V.

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte als Semi-Dry-System bei 100mA über 90 min. Durch die Inkubation in Blocking-Puffer über Nacht wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert.

2.2.3.4 Antikörper-Bindung und Belichtung

Die Primärantikörper gegen MAPK, Phospho-MAPK und β -Actin wurden 1:1000 mit Blocking-Puffer verdünnt, die Inkubationszeit betrug 1,5 h. Nach mehrfachem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Zugabe des AP-gekoppelten, 1:5000 verdünnten Sekundärantikörpers für einen Zeitraum von 45 min. Die Zugabe des aktivierten Chemolumineszens-Systems CDP-Star nach erneutem Waschen und 4-minütiger Pufferung in Assay-Puffer ermöglichte die Belichtung von ECL-Hyperfilmen über unterschiedliche Zeiträume. Zur Auswertung wurden die entwickelten Filme densitometrisch quantifiziert.

2.2.4 RT-PCR

2.2.4.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits. Hierzu wurde dem zum Kit gehörenden Lysispuffer RLT anweisungsgemäß 1% β -Mercaptoethanol als RNase-Inhibitor zugesetzt. Nach dem Absaugen des Mediums wurde in jede Petrischale 600 μ l Lysispuffer gegeben und durch 2-minütiges Schwenken gleichmäßig verteilt. Anschließend folgte eine 5 Minuten dauernde Inkubation auf Eis. Das Lysat wurde schließlich mit einem Zellschaber vollständig abgelöst und in Eppendorfgefäße pipettiert. Dort erfolgte durch mehrmaliges Pipettieren eine weitere Verflüssigung der gelartigen Substanz. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

Zur Ausfällung der DNA wurden zu jeder Probe 600 μ l 70%iges Ethanol gegeben und die ausfallenden Fragmente durch Pipettieren zerkleinert. Das entstehende Gemisch wurde in zwei Schritten auf eine RNeasy-Säule geladen, diese jeweils 1 min bei 11.500 U/min zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Die

spezifische Pufferzusammensetzung führte hierbei zur selektiven Bindung der RNA an die Säulenmembran. Es folgte die Zugabe von 700 µl RW1-Puffer, eine 2-3 minütige Inkubationszeit und eine erneute Zentrifugation bei 11.500 U/min für 1 Minute. In diesem Schritt wurden weitere nicht erwünschte Lysefragmente ausgewaschen. Durch die Zugabe von 500 µl RPE-Puffer, der zuvor mit Ethanol gemäß Anweisung vervollständigt wurde, und erneuter 1-minütiger Zentrifugation bei 11.500 U/min mußten nun die in den zuvor eingesetzten Lösungen enthaltenen Salze aus der Säule gelöst werden. Eine weitere Zugabe von 500 µl RPE-Puffer mit anschließender Zentrifugation bei 13.000 U/min für 2 Minuten schloß die Reinigung ab.

Die nun in der Säule verbliebene RNA wurde durch die zweimalige Zugabe von 30 µl H₂O, im ersten Schritt gefolgt von einer 10-minütigen Inkubationszeit, und jeweiliger Zentrifugation bei 11.500 U/min für 1 Minute in ein Eppendorfgefäß eluiert und bei –80°C gelagert.

Die Isolierung aus Tumormaterial erfolgte analog mit Hilfe des RNeasy Midi Kits nach den Empfehlungen des Herstellers.

2.2.4.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration beruht auf dem UV-Absorptionsmaximum von RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm. Von jeder Probe wurden zur Doppelbestimmung zwei 1:50 Verdünnungen hergestellt, deren OD bei 260 nm im UV-Spektrometer bestimmt wurde. Aus dem Mittelwert ergibt sich unter Einbezug des Verdünnungsfaktors und eines weiteren, für einzelsträngige Nukleinsäuren geltenden Faktors von 40 µg/µl die Probenkonzentration.

2.2.4.3 Reverse Transkription

Mittels Reverser Transkription wird die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben, die als Basis für die folgende PCR dient. Hierzu wurde je Ansatz das 1 µg RNA enthaltende Volumen in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt und auf 5 µl mit H₂O ergänzt. Als Negativkontrolle diente ein weiterer, lediglich aus 5 µl Wasser bestehender Ansatz. Hinzu kamen jeweils 15 µl des Master-Mixes, der in einem getrennten Gefäß für alle Proben gemeinsam vorbereitet wurde und wie folgt zusammengesetzt war:

- 7 µl H₂O
- 2 µl 10 x PCR-Puffer
- 2 µl dNTP
- 2 µl Hexamere
- 1 µl RNasin (40 U)
- 1 µl MMLV (200 U)

Die Ansätze durchliefen im Thermocycler folgendes Programm:

- 10 min 22°C (Anlagerung der Hexamere)
- 45 min 42°C (Transkription durch MMLV)
- 5 min 95°C (Denaturierung der Doppelstränge)

2.2.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die PCR wird die vorgelegte cDNA durch vielfach wiederholte Denaturierung und Gegenstrangsynthese vervielfältigt. Die Spezifität wird durch ein für das jeweilige Produkt ausgewähltes Primerpaar erreicht, wovon sich jeweils ein Primer an den zu ihm komplementären Template-Strang anlagert und durch die Polymerase verlängert wird.

Als Template wurden je Probe 10 µl aus der Reversen Transkription vorgelegt, die um 90 µl Master-Mix, in einem getrennten Gefäß für alle Proben vorbereitet, ergänzt wurden. Der Master-Mix hatte folgende Zusammensetzung:

- 69,5 µl H₂O
- 10,0 µl 10 x PCR-Puffer
- 8,0 µl dNTP
- 1,0 µl forward Primer (2 µM)
- 1,0 µl reverse Primer (2 µM)
- 0,5 µl AmpliTaq-Polymerase (2,5 U)

Die Ansätze durchliefen im Thermocycler folgendes Programm:

- a) 1 min 94°C (initiale Denaturierung)
- b) 1 min 94°C (Denaturierung)**
- c) 1 min 55°C (Annealing der Primer)**
- d) 1 min 72°C (Elongation durch Polymerase)**
- e) 10 min 72°C (finale Elongation)
- f) ∞ 4°C

Die Schritte b) – d) durchliefen 50 (Phosphatasen) bzw. 22 Zyklen (GAPDH).

2.2.4.5 Auftrennung von PCR-Produkten

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in 2%igem Agarose-Gel, das mit 1 x TAE-Elektrophoresepuffer unter Zusatz von 0,1% Ethidiumbromid gegossen wurde. Nach der Ergänzung von 10 Vol% DNA-Ladepuffer wurden von jeder Probe 10 µl, sowie zur Bestimmung der Fragmentlängen eine 100bp-Standard-Leiter aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 30 min bei 100 V in 1 x TAE-Elektrophoresepuffer; die Banden wurden anschließend bei 254 nm auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.2.4.6 DNA-Isolierung

Zur Isolierung der DNA wurde das QIAEX II Gel Extraction Kit gemäß Anweisung des Herstellers verwendet.

2.2.4.7 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte analog zur RNA-Konzentrationsbestimmung (Kapitel 2.2.4.2, S. 28), jedoch unter Verwendung des für DNA geltenden Faktors von 50 µg/µl.

2.2.4.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung führte Herr Dr. Martin Meixner am Institut für Genetik der Humboldt-Universität Berlin durch.

2.2.5 Northern-Blot

2.2.5.1 Bakterienkultur

Die Grundlage der Bakterienkultur waren die mit den Plasmiden transfizierten E. coli-Bakterien. Neben den Zielsequenzen enthalten die Plasmide ein Ampicillin-Resistenz-Gen, wodurch die Bakterien selektierbar waren. Daher wurde für alle hier beschriebenen Schritte das LB-Medium mit 30 µg/ml Ampicillin versetzt.

Die gelieferten E. coli-Pellets wurden mit jeweils 500 µl Medium überschichtet und 6 h bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Außerdem wurde pro Bakterien-Klon eine 10 cm-Petrischale mit 12 ml LB-Agar gegossen.

Nach der Inkubation wurden anfangs jeweils 200µl des Überstands auf einer Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Ausstrichvolumen wurde aufgrund zu starken Wachstums bei einigen Klonen bis auf 30 µl reduziert.

Am Folgetag wurden je Klon 4 Einzelkolonien in etwa 4 ml Medium überführt und erneut über Nacht bei 37°C inkubiert. Hiervon wurden am nächsten Morgen jeweils 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Eppendorfgefäß durch Ausklopfen von verbliebener Flüssigkeit befreit und bei –20°C eingefroren.

Weitere 900 µl wurden jeweils mit 900 µl Glycerol versetzt und als Glycerolstock bei –80°C gelagert.

2.2.5.2 Plasmid-Isolierung

Die Isolierung der Plasmide aus den Bakterienpellets erfolgte mit Hilfe des Qiagen Mini Prep Kits. Hierzu wurden die Pellets in je 250 µl P1-Puffer resuspendiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch die Zugabe von 250 µl P2-Puffer wurde die alkalische Lyse zu einer klaren, gelartigen Substanz sowie der RNA-Verdau durch im Puffer enthaltene RNasen erreicht. Die Zugabe von 350 µl N3-Puffer führte zur Denaturierung der Proteine, außerdem wurden pH-Wert und Salzkonzentrationen auf das Optimum zur Bindung der DNA an die Mini Prep-Säulen eingestellt. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 13.000 U/min erfolgte die Sedimentation der wolkig ausgefallenen Proteine zu einem weißen Pellet. Die Überstände wurden auf die Säulen überführt, die Pellets mit dem Eppendorfgefäß verworfen. Durch eine 1-minütige Zentrifugation konnte die an der Säulenmembran gebundene DNA von den weiteren Lösungsbestandteilen getrennt werden, letztere wurden mit dem Filtrat verworfen. Die noch vorhandenen Endonukleasen wurden durch Zugabe von 500 µl PB-Puffer und erneuter 1-minütiger Zentrifugation bei 13.000 U/min entfernt. Entsprechend erfolgte das Auswaschen der Salze durch 750 µl PE-Puffer.

Die nun in der Säule verbliebene DNA wurde durch 50µl des DNA stabilisierenden Puffers PE und Zentrifugation bei 13.000 U/min für 1 Minute in ein Eppendorfgefäß eluiert und bei –20°C gelagert.

2.2.5.3 Sondenamplifizierung mittels PCR

Aus den zuvor isolierten Plasmiden wurden durch PCR die gewünschten Sondenabschnitte amplifiziert. Folgender PCR-Ansatz kam zur Anwendung:

2,0	µl	Plasmid-Lösung, 1:100 mit H ₂ O verdünnt
12,5	µl	H ₂ O
2,0	µl	10 x PCR-Puffer
1,0	µl	dNTP
1,0	µl	forward Primer (2 µM)
1,0	µl	reverse Primer (2 µM)
0,5	µl	AmpliTaq DNA Polymerase (2,5 U)

Die Kombination von Plasmid und Primern erfolgte gemäß der aus Tabelle 2 (S. 19) zu entnehmenden Zugehörigkeiten. Zu jedem Klon wurde eine H₂O-Negativkontrolle mitgeführt.

Die Ansätze durchliefen im Thermocycler folgendes Programm:

a)	60 s	94°C (initiale Denaturierung)
b)	60 s	94°C (Denaturierung)
c)	90 s	60°C (Annealing der Primer)
d)	90 s	72°C (Elongation durch Polymerase)
e)	10 min	72°C (finale Elongation)
f)	∞	4°C

Die Schritte b) – d) durchliefen 36 Cyclen.

2.2.5.4 Elektrophoretische Auftrennung der DNA

Die elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA erfolgte in 1%igem Agarose-Gel, das mit 1 x TAE-Elektrophoresepuffer unter Zusatz von 0,1% Ethidiumbromid gegossen wurde. Nach der Ergänzung von 15 Vol% DNA-Ladepuffer wurden die vollständigen Ansätze sowie eine 100bp-Standard-Leiter zur Bestimmung der Fragmentlängen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 30 min bei 100 V in 1 x TAE-Elektrophoresepuffer.

2.2.5.5 Isolierung der gewünschten DNA-Bande

Auf einem UV-Transilluminator mit einer Wellenlänge von 254 nm wurden im Anschluß die Banden sichtbar gemacht, auf die korrekte Länge überprüft und etwa 1-2 mm vor jeder zu isolierenden Bande ein schmales, bandenbreites Rechteck des Gels ausgeschnitten. Dieses wurde mit zuvor erhitzter 0,4%igen Low-Melting-Agarose großzügig ausgefüllt, anschließend das gesamte Gel zu deren Aushärtung 30 min bei 4°C inkubiert. Schließlich folgte eine erneute Elektrophorese für wenige Minuten, bis die gewünschte Bande unter UV im Low-Melting-Gel zu finden war. Dieses, nun die gebrauchsfertige Northern-Blot-Sonde enthaltend, wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.5.6 Elektrophoretische Auftrennung der RNA

Die Isolierung der RNA wurde bereits im Kapitel 2.2.4.1, S. 27 beschrieben. Deren elektrophoretische Auftrennung erfolgte in Agarose-Gelen folgender Zusammensetzung:

2 g	Agarose
156 ml	H ₂ O
36 ml	Formaldehyd
8 ml	25 x MOPS

Formaldehyd und MOPS wurden erst nach dem Aufkochen und Abkühlen des Gels auf ca. 60°C zugegeben.

Von jeder Probe wurden 20 µl RNA-Lösung aliquotiert und aufgrund des beschränkten Taschenvolumens der Gele ca. 45 min im Vakuum reduziert. Anschließend wurden die Proben mit 18 µl RNA-Auftragspuffer versehen.

Die Proben wurden schließlich zur Degeneration 5 min auf 65°C erhitzt und bis zur Auftragung, jedoch mind. 2 min, auf Eis gelagert.

Die Elektrophorese erfolgte initial 10 min bei 240 V und eine weitere Stunde bei 200 V. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x MOPS verwendet.

Nach einer orientierenden Kontrolle der Auftrennung bei 254 nm auf einem UV-Illuminator wurde das Gel 20 min in H₂O sowie 2 x 20 min in 20 x SSC gewaschen.

2.2.5.7 *Transfer*

Zum Transfer der aufgetrennten RNA auf eine Nylonmembran wurde folgender Blot luftblasenfrei aufgebaut: Auf einer Glasplatte, die eine mit 20xSSC gefüllte Wanne überdeckte, bildete ein auf 8,5 x 19,5 cm zurechtgeschnittenes Whatmanpapier die Basis. Darauf stellte ein weiteres Whatmanpapier in gleicher Breite, aber in Längsrichtung beidseits in die Wanne reichend, die Verbindung zum 20xSSC-Vorrat her. Das gewendete Gel, dessen Transferfläche durch Parafilm eingegrenzt wurde, sowie die auf Gelgröße zurechtgeschnittene Transfermembran folgten. Den Abschluß bildeten drei auf 7,5 x 19,5 cm zurechtgeschnittene Whatmanpapiere und 15 aus je zwei Lagen gefaltete Zellstoffpakete. Die Membran wurde zuvor in H₂O aktiviert, anschließend wie alle Whatmanpapiere in 20 x SSC getränkt.

Der Transferturm wurde durch eine weitere Glasplatte abgedeckt und unter einem Gewicht von ca. 1 kg mind. 36 h inkubiert.

Nach dem Abbau erfuhr die Membran einen 5-minütigen Spülschritt in 2xSSC, nach der folgenden Lufttrocknung wurde die RNA im UV-Crosslinker fixiert.

2.2.5.8 *Radioaktive Sondenmarkierung*

Die radioaktive Markierung der zuvor hergestellten Sonden beruht auf der Neusynthese eines komplementären DNA-Strangs, in den ³²P-markierte Nukleotide eingebaut werden. Hierzu wurde das Megaprime DNA Labelling System verwendet. Für jede zu hybridisierende Membran wurden 10 µl Sonde vorgelegt, 5 µl der im Kit enthaltenen Random-Primer und 18 µl H₂O ergänzt. Zur Denaturierung wurden die Ansätze 5 min auf 99°C erhitzt. Anschließend wurden 10 µl Labelling-Puffer, 5 µl ³²P-dCTP und 2 µl Klenow-Enzym hinzugefügt. Die Synthese des markierten Strangs erfolgte in der folgenden 30-minütigen Inkubation bei 37°C, nach der die Enzymaktivität durch 5 µl 0,2M EDTA gestoppt wurde. Zur Denaturierung der beiden Sondenstränge wurden die Ansätze nochmals 5 min auf 99°C erhitzt und direkt auf Eis gelagert, um eine erneute Hybridisierung der gerade getrennten Stränge zu vermeiden.

2.2.5.9 *Hybridisierung*

Zunächst erfolgte die 30-minütige Vorhybridisierung der Membranen mit jeweils 10 ml Hybridisierungslösung bei 68°C, bevor die Sonden zur 1-stündigen Hybridisierung bei gleichbleibender Temperatur zugegeben wurden. Anschließend erfolgten zwei 20- bis 30-minütige Waschschrte mit Waschpuffer 1 bei Raumtemperatur sowie zwei ebenfalls 20- bis 30-minütige Waschschrte mit Waschpuffer 2 bei 50°C. Schließlich folgte die Exposition von BIOMAX MS-Röntgenfilmen durch die in Haushaltsfolie versiegelten Blots unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei -80°C.

2.2.5.10 Densitometrische Auswertung

Zur Auswertung wurden die entwickelten Filme densitometrisch quantifiziert. Die Verrechnung potentieller Fehler, etwa bedingt durch unterschiedliche Auftragsmengen oder ungleichmäßigen Transfer, erfolgte durch den Vergleich mit einer GAPDH-Re-Hybridisierung der jeweiligen Blots. Bei Vergleichen verschiedener Blots diente die basale Expression zum Zeitpunkt 0 als Orientierung, diese erhielt willkürlich den Wert 100%.

2.2.6 Immunhistologie

2.2.6.1 Patientenkollektiv

Die immunhistochemische Analyse erfolgte retrospektiv an Proben der Routinediagnostik, bei denen das Einverständnis zur Verwendung für wissenschaftliche Untersuchungen vorlag. Die Auswahl wurde auf primäre Ovarialkarzinome aus den Jahren zwischen 1991 und 2001 mit ausreichend archiviertem Tumormaterial begrenzt. Das Kollektiv umfaßte 66 invasive primäre Ovarialkarzinome sowie 13 Borderline-Tumore. Weiterhin wurden 11 benigne Zystadenome sowie 11 normale Ovarien untersucht.

Alle Fälle wurden von Prof. Dr. med. Steffen Hauptmann hinsichtlich der klinisch-pathologischen Diagnose, histologischem Typ, Staging und Grading reevaluiert.

Das Gesamtüberleben wurde definiert als Zeit zwischen Diagnose und Tod, entsprechende Daten wurden vom Landeseinwohneramt unter Einhaltung der Richtlinien des Datenschutzes erfragt. Das rezidivfreie Überleben wurde bestimmt als Zeit zwischen Diagnose und dem Auftreten von lokalen oder fernen Rezidiven, die klinisch oder pathologisch festgestellt wurden. Entsprechende Aufzeichnungen waren für 46 der 66 Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom verfügbar.

2.2.6.2 Immunhistologische Färbung

Die ca 5 µm dicken Schnitte wurden zunächst in Xylol entparaffiniert, anschließend folgte die Fixation in absteigender Alkoholreihe. Eine 5-minütige Erhitzung unter Überdruck in Zitratpuffer ging der Antikörper-Färbung voraus, die bei 4°C mit dem 1:1000 verdünnten, polyklonalen MKP-1-Antikörper über Nacht erfolgte. Die Inkubation mit dem biotinyliertem anti-rabbit-Zweitantikörper sowie dem multilink biotin-streptavidin-amplified detection system erfolgte über jeweils 20 Minuten bei Raumtemperatur, die Anfärbung schließlich durch das fast-red chromogen system. Als Positivkontrolle wurde Nerven- und Gangliongewebe gefärbt⁶⁹. Die immunhistologische Färbung erfolgte größtenteils durch Frau Ines Koch.

2.2.6.3 *Auswertung*

Die Färbungen wurden unabhängig voneinander durch zwei Pathologen (Prof. Dr. med. Steffen Hauptmann und Dr. med. Carsten Denkert) ausgewertet. Die Einteilung erfolgte in MKP-1-negative Fälle (keine oder schwache Färbung) und MKP-1-positive Fälle (moderate und starke Färbung).

2.2.6.4 *Statistik*

Die Signifikanz wurde in SPSS V10.0 unter Nutzung des χ^2 - bzw. des Fisher-Tests berechnet. Die univariaten Überlebenskurven entstanden nach der Methode von Kaplan und Meier, die vergleichende Signifikanz-Berechnung erfolgte mit dem log-rank-Test. Die multivariate Analyse basierte auf dem „Cox proportional hazard regression model“.

Generell wurden p -Werte $< 0,05$ als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Basale MAPK-Phosphatasen-Expression (PCR)

Zur Orientierung über Vorhandensein und basale Expression der MAPK-Phosphatasen erfolgte ein initiales PCR-Screening von 8 humanen Tumorzelllinien:

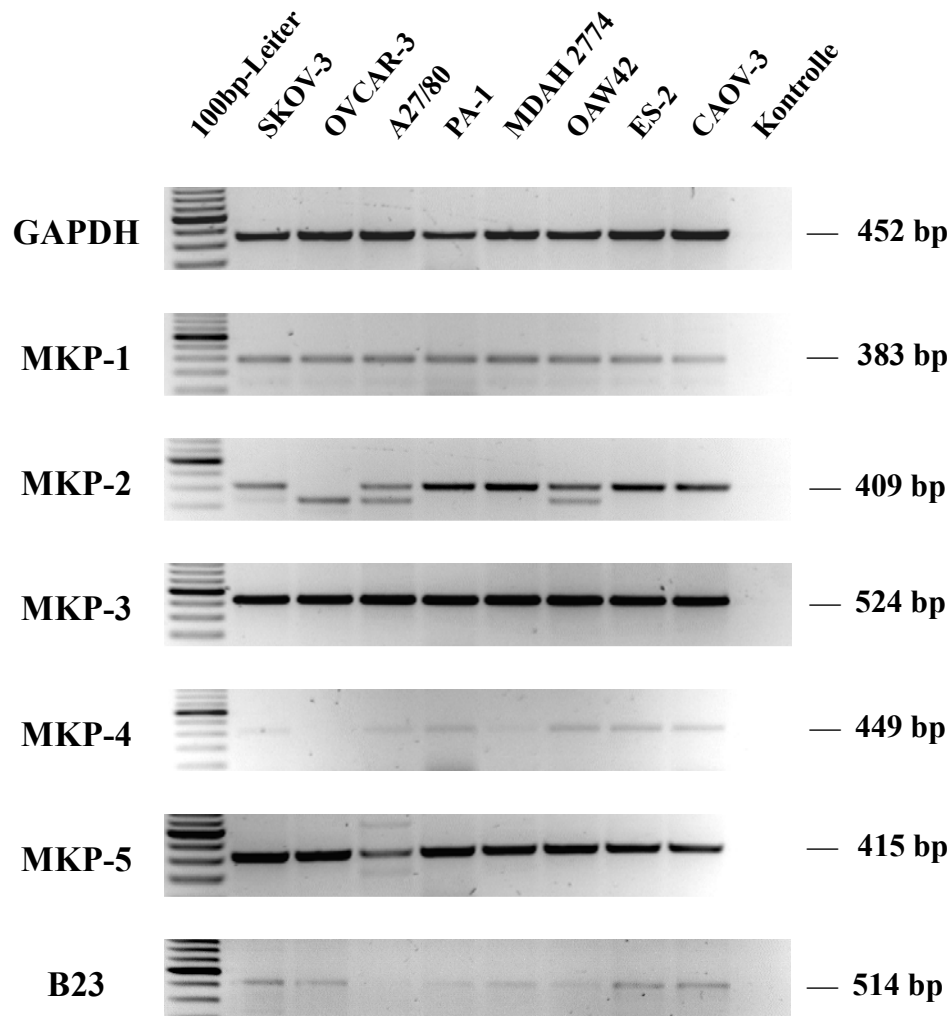


Abbildung 4: PCR-Screening. Gleichmäßige Expression von MKP-1 und MKP-3, MKP-5 lediglich in A27/80 reduziert. MKP-2 in PA-1, MDAH2774, ES-2 und CAO V-3 deutlich, in SKOV-3, A27/80 und OAW42 schwach und in OVCAR-3 nicht exprimiert. MKP-4 und B23 nicht oder nur schwach exprimiert.

MKP-1, MKP-3 und MKP-5 zeigen in allen dargestellten Zelllinien eine gleichmäßige Expression, lediglich A27/80-Zellen weisen eine geringfügige Reduktion der MKP-5 auf.

Im Screening auf MKP-2 wurde neben der zu erwartenden Bande bei 409 bp eine weitere bei etwa 340 bp sichtbar. Durch Sequenzierung konnte die 409bp-Bande als MKP-2 identifiziert werden. Somit fehlt in OVCAR-3-Zellen die MKP-2, in SKOV-3, A27/80 und OAW42 besteht eine reduzierte MKP-2-mRNA-Produktion. Die Phosphatasen MKP-4 und B23 werden von den untersuchten Zellen ohne Stimulation nicht oder nur schwach exprimiert.

Die funktionelle Bedeutung der Phosphatasen ist durch die Untersuchung der Basalexpression nicht ausreichend beschrieben. Vielmehr ist ihre Regulation in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen zu betrachten.

3.2 Regulation der Phosphatasen MKP-1 und MKP-3

3.2.1 Auswahl der Aktivatoren und Zelllinien

3.2.1.1 *Induktion der MKP-1 durch IL-1 β und TNF α*

Zunächst wurden die Zelllinien SKOV-3 und OVCAR-3 mit einigen potentiellen Aktivatoren untersucht. Zum Einsatz kamen Interleukin-1 β (10 ng/ml), Interleukin-6 (10 ng/ml), Tumornekrose-Faktor α (10 ng/ml) und der Phorbol-Ester TPA (2,5 nmol/ml).

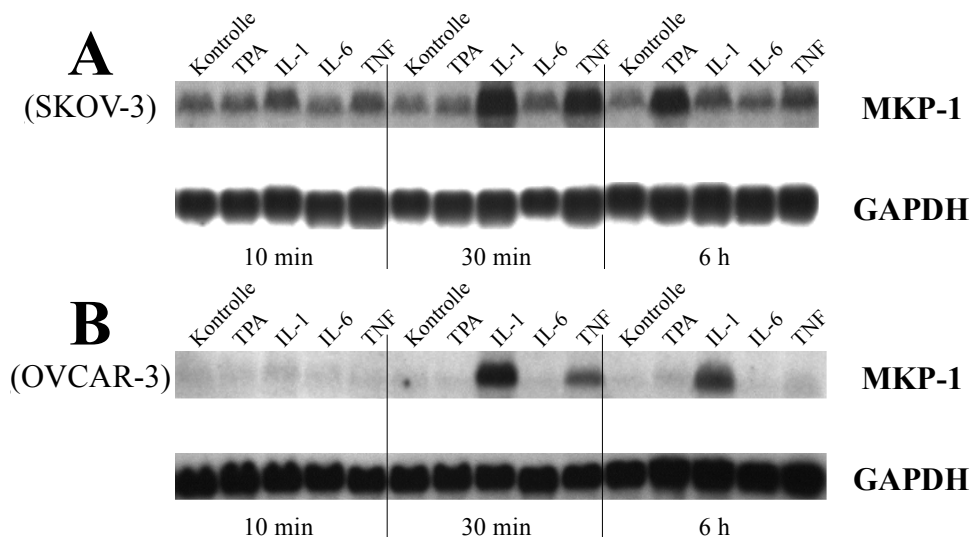


Abbildung 5: MKP-1-Northern Blot. Stimulation mit TPA, IL-1 β und TNF α für 10 min, 30 min und 6 h. Deutliche Induktion 30 min nach IL-1 β - oder TNF α -Zugabe in SKOV-3(A) und OVCAR-3(B). In OVCAR-3 Nachweis der MKP-1 noch 6 h nach IL-1 β -Zugabe. SKOV-3 zeigt zusätzlich eine MKP-1-Expression 6 h nach TPA.

Die MKP-1-Expression beider Zelllinien reagiert deutlich auf IL-1 β und TNF α , bei SKOV-3 ist zusätzlich eine TPA-bedingte Induktion nach 6 Stunden zu erkennen. Dagegen beeinflusst IL-6 die MKP-1 zu keinem Zeitpunkt. Die weiteren Versuche wurden nur noch mit den deutlichen Induktoren IL-1 β und TNF α durchgeführt.

Im Gegensatz zum zuvor gezeigten PCR-Screening zeigt der Northern Blot keine Basalexpression der MKP-1 in OVCAR-3. Dieser vermeintliche Widerspruch erklärt sich aus den unterschiedlichen Nachweisgrenzen der beiden Methoden.

Aufgrund der unterschiedlichen MKP-1-Regulation in den beiden Zelllinien wurde nachfolgend das Verhalten in weiteren Zelllinien gegenübergestellt.

3.2.1.2 MKP-1-Induktion in Abhängigkeit von der Zelllinie

Unter Verwendung der aktivierenden Zytokine IL-1 β und TNF α erfolgte nun ein Induktionsversuch in vier Ovarialkarzinomzelllinien:

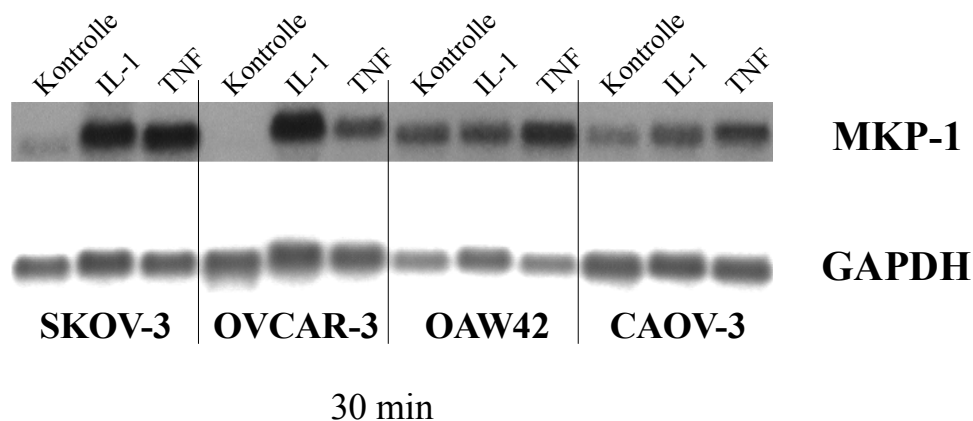


Abbildung 6: MKP-1-Northern-Blot. SKOV-3 und OVCAR-3 zeigen keine basale Expression bei deutlicher Induzierbarkeit durch IL-1 β und TNF α . OAW42 und CAOV-3 exprimieren MKP-1 bereits ohne Zytokin-Zugabe, nach Zugabe zeigt sich nur eine mäßige Steigerung.

Der deutlichen Induzierbarkeit in SKOV-3 und OVCAR-3 steht eine deutlich schwächere Induzierbarkeit in OAW42 und CAOV-3 gegenüber. Letztere exprimieren das Enzym jedoch konstitutiv.

Für die fein abgestimmte Regulation der MAP-Kinasen ist darüber hinaus der Zeitverlauf der Phosphatasen-Expression von großer Bedeutung. Dieser wurde nachfolgend untersucht:

3.2.2 Zytokin-induzierte mRNA-Expression (MKP-1)

Um unterschiedliche Zeitverläufe zu erfassen, wurden nachfolgend Zeitreihen der MKP-1-Expression nach IL-1 β bzw. TNF α -Zugabe in allen vier Karzinom-Zelllinien untersucht. Zur Orientierung über den physiologischen Zustand ist zudem das Verhalten in der aus gesundem Oberflächenepithel etablierten Zelllinie HOSE dargestellt:

3.2.2.1 HOSE

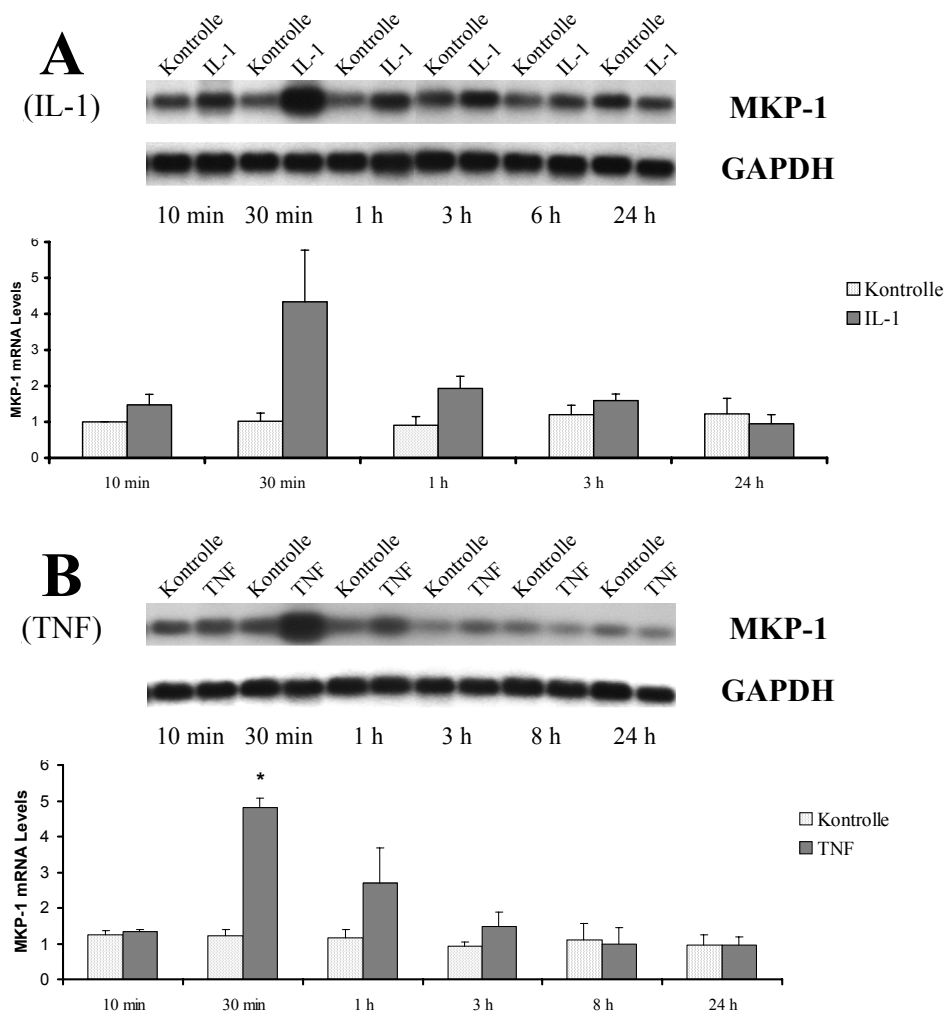


Abbildung 7: MKP-1-Northern-Blot. Zeitreihen in HOSE nach Zugabe von IL-1 β (A) bzw. TNF α (B), jeweils Darstellung eines repräsentativen Blots und densitometrischer Quantifizierung. Mittelwert aus 2(A) bzw. 3(B) unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. *: Signifikanz zur Kontrolle. Nach IL-1 β deutlicher Anstieg nach 30 min und bereits nach kurzer Zeit Rückgang zum basalen Level. Ähnliches Verhalten nach TNF α mit hoher Signifikanz nach 30 min ($p=0,0001$).

Im Verlauf zeigt HOSE nach beiden Zytokinen einen deutlichen MKP-1-Anstieg nach 30 min, im Anschluß sinkt die MKP-1-Expression innerhalb weniger Stunden wieder auf das Ausgangsniveau ab.

3.2.2.2 SKOV-3

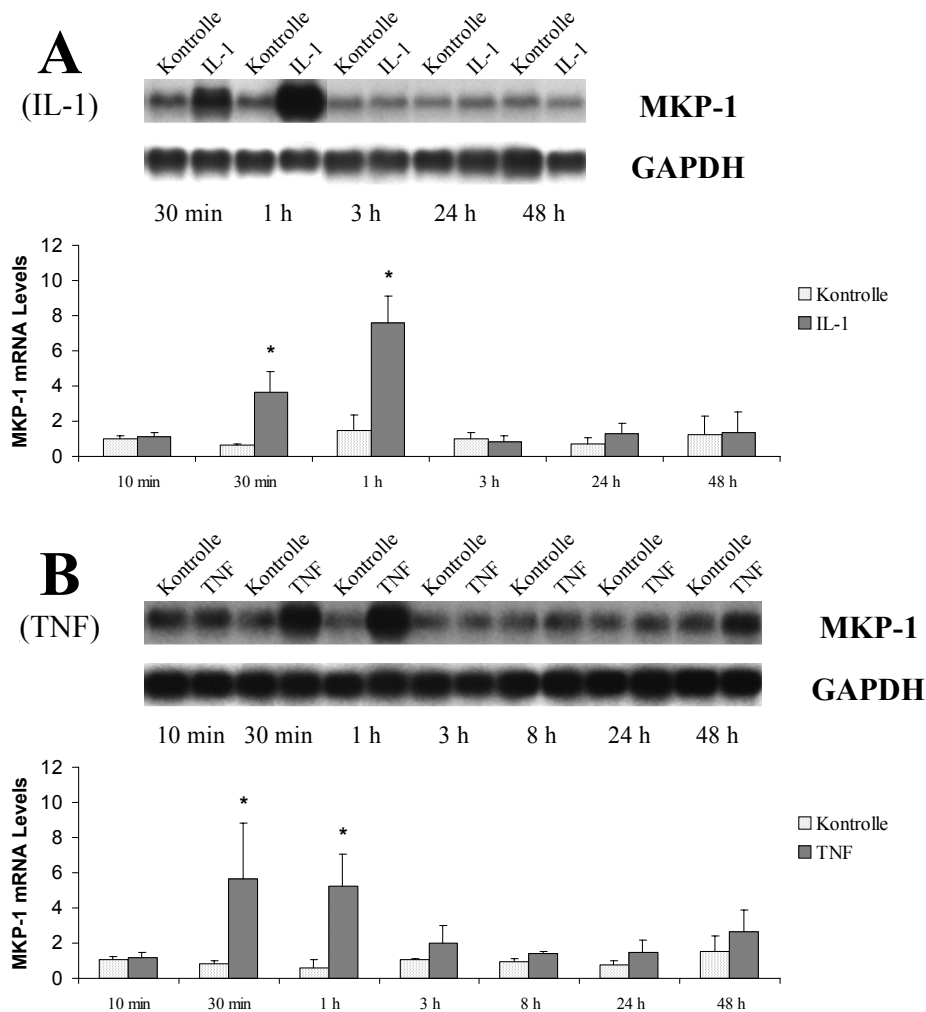


Abbildung 8: MKP-1-Northern-Blot. Zeitreihen in SKOV-3 nach Zugabe von IL-1 β (A) bzw. TNF α (B), jeweils Darstellung eines repräsentativen Blots und densitometrischer Quantifizierung. Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. *: Signifikanz zur Kontrolle. Durch IL-1 β signifikanter Anstieg nach 30 min ($p=0,023$) und 1 h ($p=0,008$), nach 3 h Rückgang auf Basalwert. Durch TNF α -Zugabe Anstieg nach 30 min ($p=0,038$) und 1 h ($p=0,025$). Nach 3 h Rückgang unter die Signifikanz-Grenze.

In SKOV-3 beträgt die MKP-1-mRNA-Expression nach IL-1 β und TNF α -Zugabe zu den Zeitpunkten 30 min und 1 h mindestens das 4-fache der jeweiligen Kontrolle. Nach 3 h ist in beiden Fällen keine signifikante Erhöhung mehr nachzuweisen.

3.2.2.3 OVCAR-3

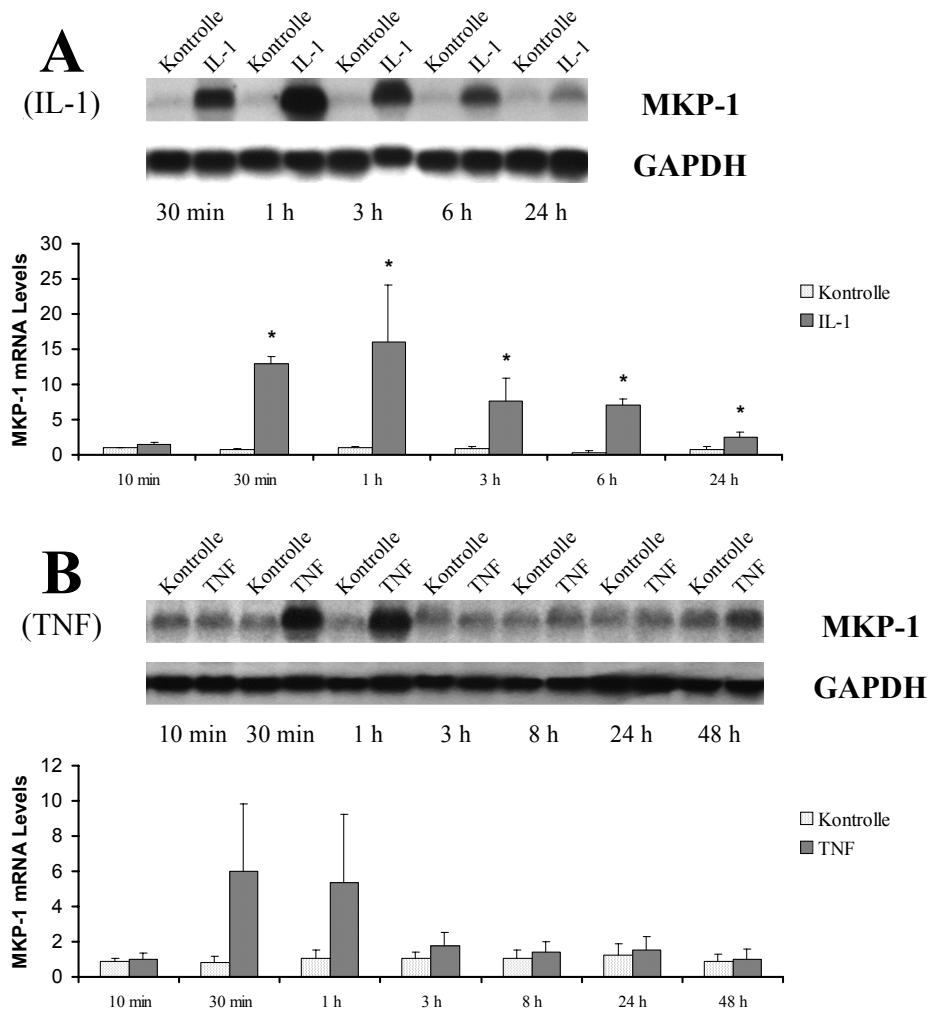


Abbildung 9: MKP-1-Northern-Blot. Zeitreihen in OVCAR-3 nach Zugabe von IL-1 β (A) bzw. TNF α (B), jeweils Darstellung eines repräsentativen Blots und densitometrischer Quantifizierung. Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. *: Signifikanz zur Kontrolle. Durch IL-1 β signifikanter Anstieg nach 30 min ($p=0,0001$), Höchstwert nach 1 h ($p=0,019$) und langsamer Abfall bis 24 h (3 h: $p=0,009$, 6 h: $p=0,0004$, 24 h: $p=0,049$). Durch TNF α -Zugabe kurzfristiger Anstieg nach 30 min, der jedoch keine Signifikanz erreicht ($p=0,057$).

OVCAR-3 zeigt ebenfalls eine deutliche MKP-1-Erhöhung 30 min und 1 h nach IL-1 β -Zugabe. Im Vergleich zu SKOV-3 ist diese Aktivierung jedoch über viele Stunden deutlich prolongiert, erst der 24 h –Wert deutet bei noch signifikanter Erhöhung einen Rückgang zum Ausgangsniveau an. Die Induktion durch TNF α nach 30 min und 1 h erreicht keine Signifikanz.

3.2.2.4 OAW42

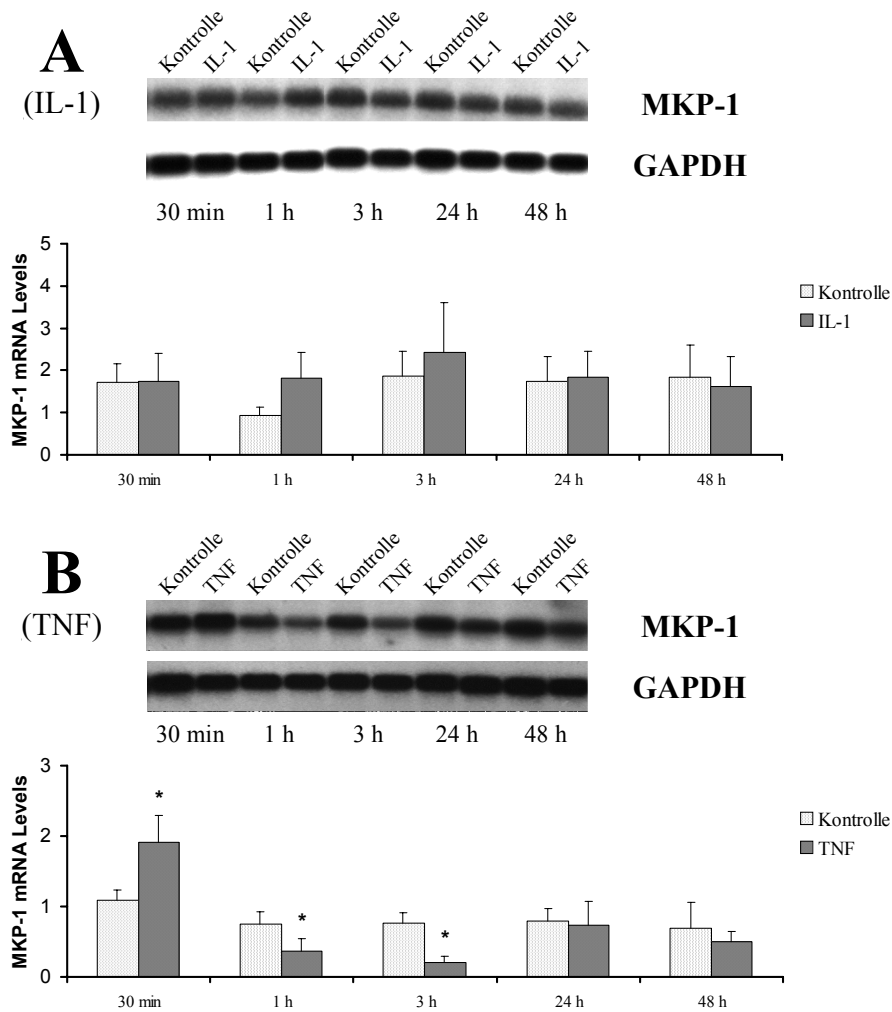


Abbildung 10: MKP-1-Northern-Blot. Zeitreihen in OAW42 nach Zugabe von IL-1 β (A) bzw. TNF α (B), jeweils Darstellung eines repräsentativen Blots und densitometrischer Quantifizierung. Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. *: Signifikanz zur Kontrolle. Keine Reaktion unter IL-1 β . Nach TNF α zunächst signifikanter Anstieg nach 30 min ($p=0,012$), nach 1 h und 3 h signifikanter Abfall (1 h: $p=0,036$, 3 h: $p=0,002$).

OAW42 zeigt unter IL-1 β keine MKP-1-Reaktion. Im Zeitverlauf nach TNF α findet sich nach 30 min zunächst eine MKP-1-Induktion. Im weiteren Verlauf fällt jedoch eine Reduktion der MKP-1-Expression nach 1 h und 3 h auf. In ergänzenden Versuchen zeigte sich diese auch nach 2 h (nicht gezeigt). Zum 24 h-Meßpunkt liegt die MKP-1-Expression nach TNF α -Zugabe wieder im Bereich der mitgeführten Kontrolle.

3.2.2.5 CAOV-3

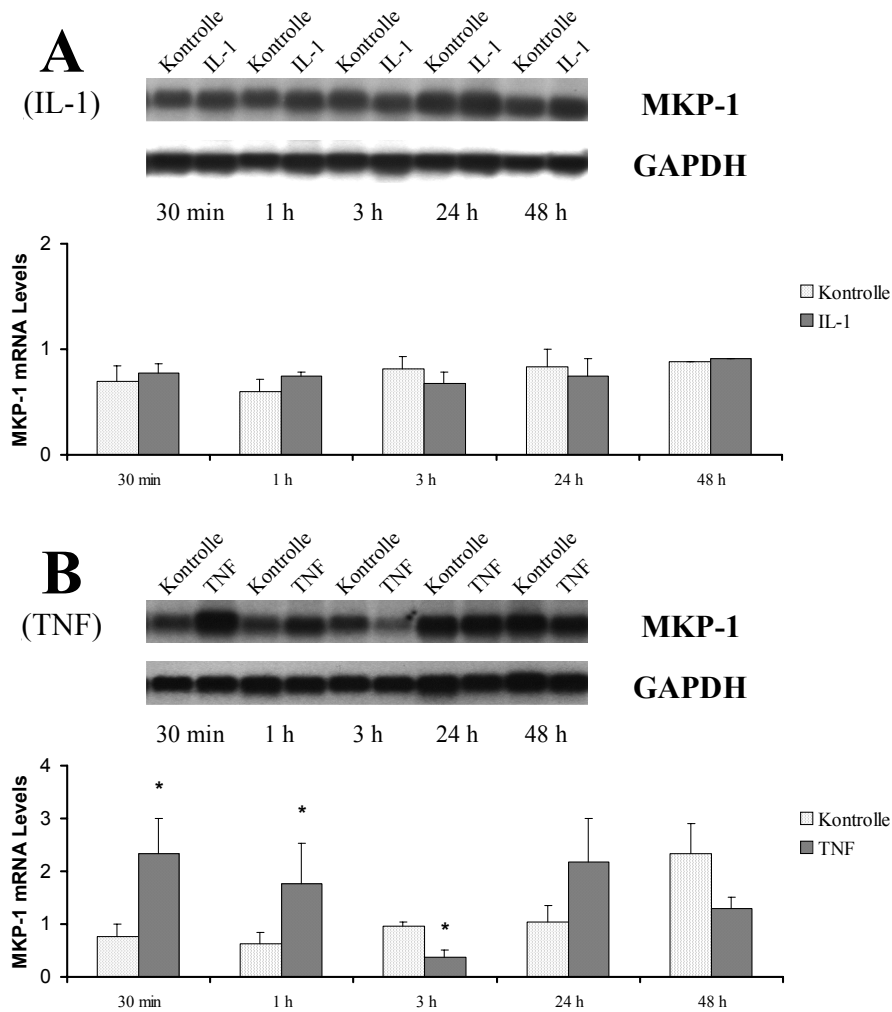


Abbildung 11: MKP-1-Northern-Blot. Zeitreihen in CAOV-3 nach Zugabe von IL-1 β (A) bzw. TNF α (B), jeweils Darstellung eines repräsentativen Blots und densitometrischer Quantifizierung. Mittelwert aus 2(A) bzw. 3(B) unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. *: Signifikanz zur Kontrolle. Keine Reaktion unter IL-1 β . Nach TNF α zunächst signifikanter Anstieg nach 30 min ($p=0,002$) und 1 h ($p=0,020$). Zum Zeitpunkt 3 h signifikanter Abfall unter den Kontrollwert ($p=0,0001$), nach 24 h erneuter Anstieg.

Die Reaktion der Zelllinie CAOV-3 ist mit dem Verhalten der zuvor gezeigten vergleichbar. Unter IL-1 β zeigt sich keinerlei Reaktion. TNF α bewirkt zunächst eine Induktion, später eine Reduktion des MKP-1-Niveaus. Ein Unterschied findet sich allerdings im Zeitverlauf – die initiale Induktion hält bis zum Zeitpunkt 1 h an, erst danach fällt die MKP-1-Expression unter den Wert der mitgeführten Kontrolle ab. Ein zweiter Anstieg zeigt sich 24 h nach Stimulation mit TNF α .

3.2.2.6 Übersichts-Tabelle

Tabelle 4: maximale MKP-1-Induzierbarkeit nach 30 min bzw. 1 h

<u>MKP-1-Expression</u>			
	basal	IL-1β	TNFα
HOSE	+	4,5	5,0
SKOV-3	+	8,0	6,0
OVCAR-3	(+)	16,0*)	6,0
OAW42	++	(1,5)	2,0**)
CAOV-3	+	(1,0)	2,5**)

*) verlängerte Aktivität bis 24 h

***) nach initialer Induktion hochsignifikanter Abfall unter den Kontrollwert nach 3 h

3.2.3 p38-Aktivität im Zeitverlauf (Western-Blot)

Die Induktion der MAPK-Phosphatasen ist im Zusammenspiel mit ihren Zielproteinen zu betrachten. Daher ist nachfolgend exemplarisch der Aktivitätsverlauf der p38-MAPK in OVCAR-3, gemessen am Anteil des phosphorylierten Proteins, im Western-Blot dargestellt. Densitometrisch wurde das Verhältnis des phosphorylierten Anteils zum Gesamtprotein bestimmt.

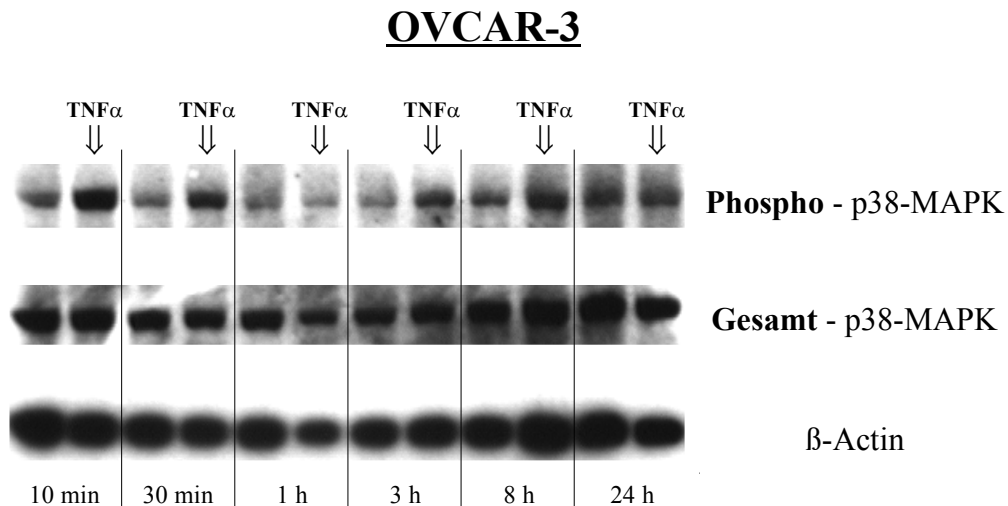


Abbildung 12: p38-Western Blot. Deutliche Phosphorylierung nach 10 min und 30 min.

Demnach erfolgt in OVCAR-3 nach $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation eine schnelle Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges innerhalb einiger Minuten.

3.2.4 Untersuchungen der MKP-1 auf Proteinebene

Neben den Untersuchungen der Zielproteine wurden auch Western Blots zum Nachweis der MKP-1 durchgeführt. Diese zeigten andeutungsweise den erwarteten Anstieg der Proteinmenge nach etwa 1 h, die Signale waren jedoch zu schwach, um auswertbare Abbildungen zu erhalten. Als Ursache ist wohl die Instabilität der MKP-1 anzusehen, durch die im Verlauf der Aufarbeitung ein Großteil des Proteins verloren geht. Da die Regulation der MKP-1 auf Transkriptionsebene erfolgt^{60,70,71}, wurde auf eine Optimierung des Proteinnachweises verzichtet.

3.2.5 Zytokin-induzierte mRNA-Expression (MKP-3)

Die unterschiedlichen Zeitverläufe nach IL-1 β bzw. TNF α -Zugabe wurden nachfolgend auch für die Phosphatase MKP-3 in allen vier Karzinom-Zelllinien sowie der Vergleichszelllinie HOSE untersucht. Exemplarisch ist der Verlauf in OVCAR-3-Zellen abgebildet:

3.2.5.1 OVCAR-3

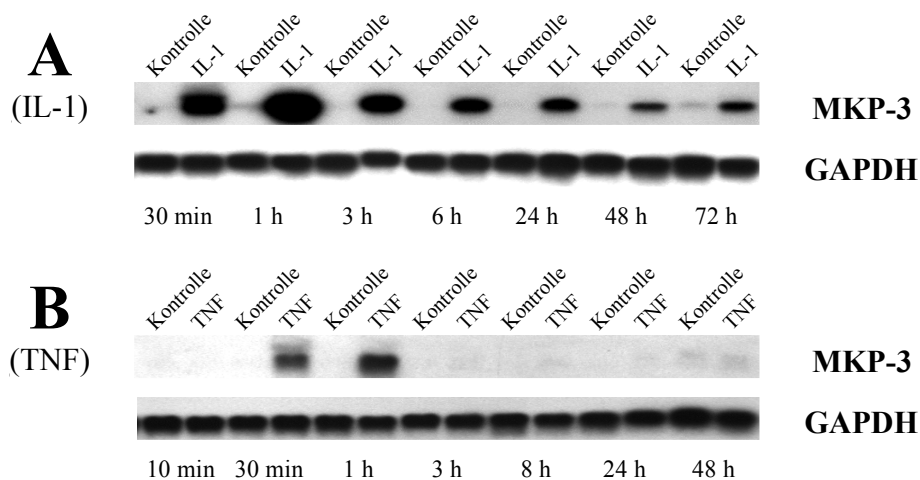


Abbildung 13: MKP-3-Northern Blot. MKP-3-Induktion durch IL-1 β (A) bereits nach 30 min bis über 72 h hinaus, Maximum bei 1 h. Nach TNF α (B) Induktion nach 30 min und 1 h.

In OVCAR-3 wird die MKP-3 bei sehr geringer Basalexpression sowohl durch IL-1 β als auch durch TNF α deutlich induziert, das Maximum liegt jeweils bei 1 h. Nach Induktion durch IL-1 β findet sich ein kontinuierlicher Abfall des MKP-3-Niveaus, die minimale Basisexpression wird auch nach 72 h noch nicht erreicht. Im Gegensatz dazu ist diese Phosphatase nach TNF α -Zugabe bereits 3 h später kaum noch nachweisbar.

Das densitometrisch bestimmte Ausmaß der Induktion sowie die Induzierbarkeit in anderen Zelllinien sind der nachfolgenden Tabelle 5 zu entnehmen.

3.2.5.2 Übersichtstabelle

Tabelle 5: maximale MKP-3-Induzierbarkeit nach 30 min bzw. 1 h

<u>MKP-3-Expression</u>			
	basal	IL-1β	TNFα
HOSE	+	(1,0)	(1,0)
SKOV-3	+	2,0*)	1,5
OVCAR-3	-	50,0**)	50,0
OAW42	+	(1,5)	(1,0*)
CAOV-3	(+)	(1,0)	4,0

*) Reduktion nach 3 h

**) verlängerte Aktivität bis 72 h

3.3 Suppression der Phosphatasen durch verschiedene Inhibitoren

MAPK-Phosphatasen greifen mit unterschiedlicher Affinität inaktivierend in die verschiedenen MAPK-Signaltransduktionswege ein. Bisher ist allerdings nur wenig über die Aktivierungswege der Phosphatasen bekannt. Die unterschiedlichen Expressionsmuster der Phosphatasen in verschiedenen Zelllinien ließen sich möglicherweise durch zelllinienabhängige Unterschiede in diesen Signalwegen oder deren Aktivitätsgrad erklären. Daher wurden mehrere Signalwege mittels spezifischer Inhibitoren ausgeschaltet. Hierbei ist zu beachten, daß die Spezifität von Inhibitoren nur innerhalb bestimmter Konzentrationsbereiche sichergestellt ist. Bei höheren Konzentrationen besteht die Möglichkeit der Hemmung weiterer Proteine mit ähnlicher Struktur, beispielsweise weiterer Varianten einer Proteinfamilie.

3.3.1 Inhibitoren des MAPK-Signalweges

3.3.1.1 Hemmung der MKP-1 in SKOV-3

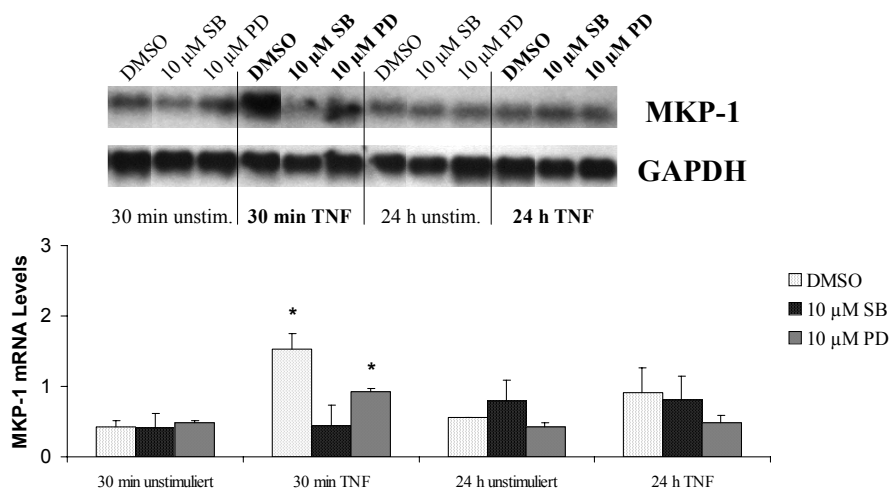


Abbildung 14: MKP-1-Northern-Blot. Einfluß der Inhibitoren SB203580 und PD 98059 auf die MKP-1-Expression in SKOV-3 nach Zugabe von TNF α . Darstellung eines Blots und densitometrischer Quantifizierung: Mittelwert aus 2 unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. *: Signifikanz TNF α -stimuliert zur unstimulierten Kontrolle. Die DMSO-Kontrolle reagiert signifikant auf TNF α ($p=0,046$), bei SB-Vorbehandlung ($10\text{ }\mu\text{M}$) zeigt sich keine Reaktion ($p=0,941$). Unter PD-Einfluß ergibt sich wieder eine signifikante Reaktion ($p=0,015$), die Dimension der DMSO-Kontrolle wird jedoch nicht erreicht.

Die Aktivierung der MKP-1 durch $\text{TNF}\alpha$ kann durch Zugabe von Inhibitoren des MAPK-Signalweges beeinflusst werden: Der p38-MAPK-Inhibitor SB203580 (SB) blockiert in einer Konzentration von 10 μM die MKP-1-Induktion fast vollständig. Der Inhibitor PD98059, der den p42/44-MAPK-Signalweg zwischen *raf* und MKK1 blockiert, läßt eine signifikante Induktion durch $\text{TNF}\alpha$ zu. Das Niveau der DMSO-Kontrolle wird jedoch nicht erreicht.

Diese Inhibitoreffekte fanden sich auch in OVCAR-3-Zellen unter $\text{TNF}\alpha$ (nicht gezeigt).

3.3.1.2 Hemmung der MKP-3 in SKOV-3

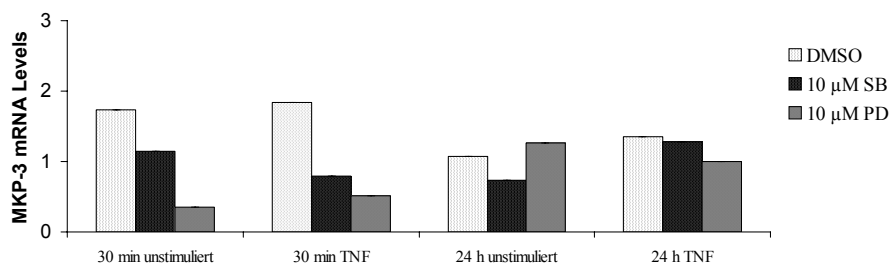


Abbildung 15: MKP-3-Northern Blot. Einfluß von MAPK-Inhibitoren auf die MKP-3-Expression unter $\text{TNF}\alpha$ in SKOV-3. Nach 30 min unabhängig von Stimulation deutlicher MKP-3-Rückgang durch PD98059. Etwas schwächere Reaktion unter SB203580. Keine eindeutige Inhibition nach 24 h.

Analog zur Phosphatase MKP-1 sollten auch für die Phosphatase MKP-3 die potentiellen Aktivierungswege untersucht werden. Hier zeigte sich, daß die Zugabe des p42/44-MAPK-Inhibitors PD98059 nach 30 min eine deutlichere Reduktion des MKP-3-Levels im Vergleich zum ebenfalls inhibierenden p38-Inhibitor SB203580 hervorrufen konnte. Diese Effekte waren unabhängig von der $\text{TNF}\alpha$ -Zugabe. Nach 24 h war keine eindeutige Inhibition mehr erkennbar.

3.3.2 Inhibitoren der atypischen PKC

3.3.2.1 Hemmung der MKP-1

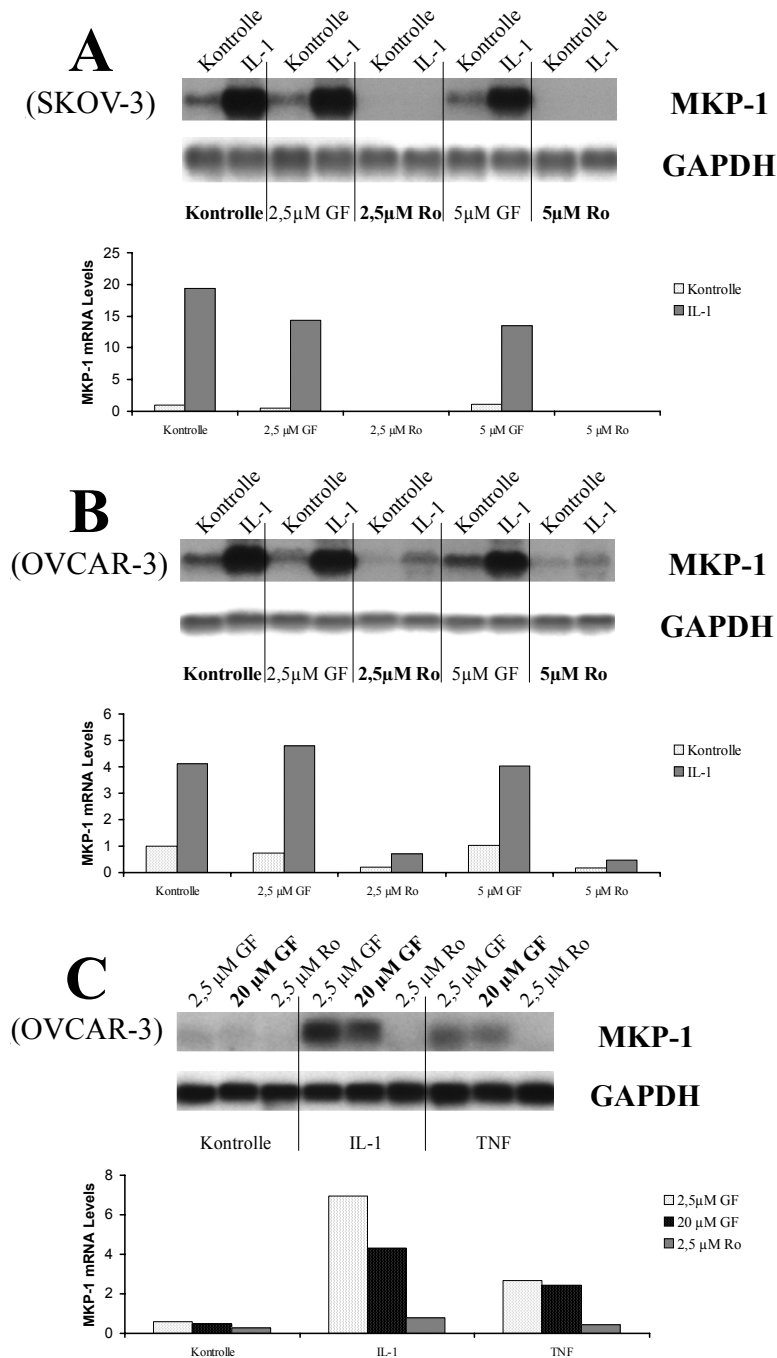


Abbildung 16: MKP-1-Northern-Blot. Einfluß der Inhibitoren GF109203X und Ro-31-8220 auf die MKP-1-Expression in SKOV-3(A) und OVCAR-3(B) nach Zugabe von IL-1 β . Einfluß von hohen Konzentrationen des Inhibitors GF109203X auf die MKP-1-Expression in OVCAR-3 nach Zugabe von IL-1 β und TNF α (C). Jeweils Blot und densitometrische Quantifizierung. Deutliche Inhibierung durch Ro in beiden Zelllinien, nur geringe Reaktion auf 2,5 μ M und 5 μ M GF. Bei einer GF-Konzentration von 20 μ M mäßige Reduktion der MKP-1-Induktion nach IL-1 β .

In beiden Zelllinien ist durch den Inhibitor Ro-31-8220 eine deutliche Inhibierung des Interleukin-1 β -Effektes auf MKP-1 zu erkennen. Diese wird bereits bei einer Konzentration von 2,5 μ M erreicht. Ro-31-8220 gilt als Inhibitor aller bekannten Varianten der PKC.

Bei Verwendung des Inhibitors GF109203X tritt keine wesentliche Hemmung auf. Dieser Inhibitor hat eine hohe Selektivität gegenüber den PKC-Isoformen α , β , γ , δ und ϵ .

Erst bei einer GF-Konzentration von 20 μ M, bei der die Hemmung weiterer Isoformen denkbar ist, findet sich in OVCAR-3-Zellen nach IL-1 β -Zugabe im Gegensatz zu den Konzentrationen 2,5 μ M und 5 μ M eine deutliche Reduktion der MKP-1-Expression.

3.3.2.2 Hemmung der MKP-3

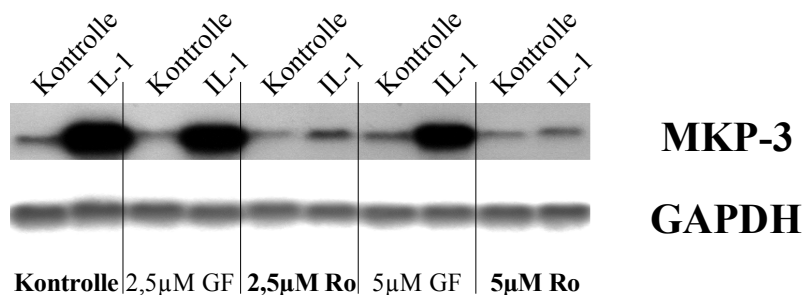


Abbildung 17: MKP-3-Northern Blot. Einfluß der Inhibitoren GF109203X und Ro-31-8220 auf die MKP-3-Expression in OVCAR-3 nach Zugabe von IL-1 β . Deutliche Inhibierung durch Ro, nur geringe Reaktion auf GF.

Analog zur Reaktion der MKP-1 konnte auch die IL-1 β -induzierte MKP-3-Expression in OVCAR-3-Zellen durch den Inhibitor Ro-31-8220 gehemmt werden. Bei Verwendung des Inhibitors GF109203X zeigt sich erst bei steigender Konzentration eine Reduktion des Phosphatasen-Levels.

3.3.3 Inhibitoren des PI3K-Signalweges

Versuche mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 brachten aufgrund einer erheblichen Zytotoxizität keine eindeutigen Ergebnisse.

3.4 Expression im Ovarialkarzinom und prognostische Bedeutung

3.4.1 Expressionsunterschiede der MKP-1 auf mRNA-Ebene in Tumormaterial

Neben der Untersuchung von Zelllinien wurde auch Tumormaterial auf das Vorhandensein der MKP-1 im Northern-Blot untersucht. Hierdurch sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der MKP-1-Expression und histologischem Typ bzw. Grading aufgedeckt werden. Die Auswahl der Proben erfolgte anhand der zur RNA-Isolierung ausreichenden Verfügbarkeit von Tumormaterial.

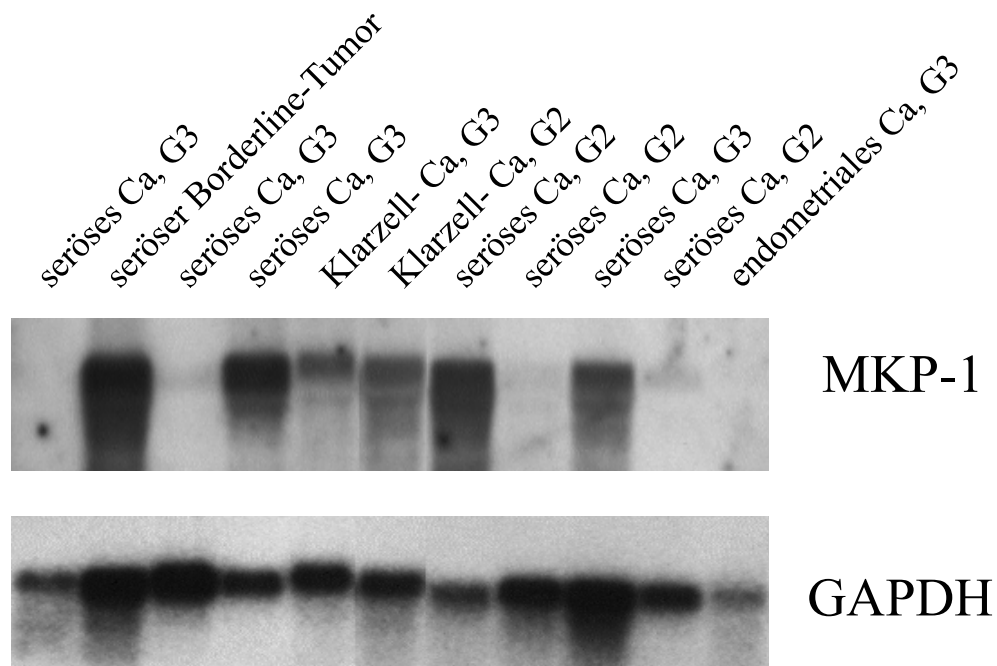


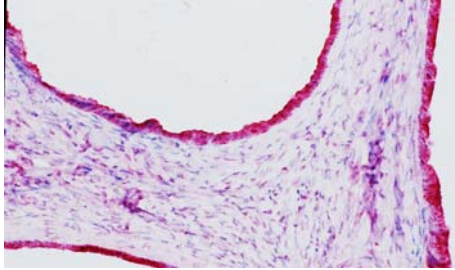
Abbildung 18: MKP-1-Northern-Blot. Expressionsunterschiede in Tumormaterial ohne Korrelation mit histologischer Differenzierung oder Grading.

Die Abbildung zeigt erhebliche Unterschiede der MKP-1-mRNA-Transkription in verschiedenen Tumoren. Ein offensichtlicher Zusammenhang zu histologischer Differenzierung und Grading besteht nicht.

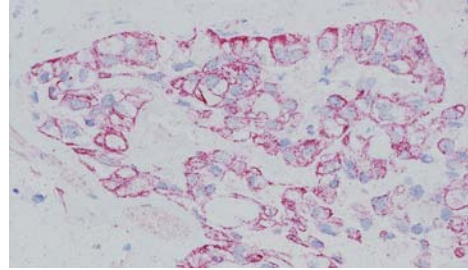
Daher wurde nachfolgend ein größeres Kollektiv immunhistologisch untersucht.

3.4.2 Immunhistologische Untersuchungen

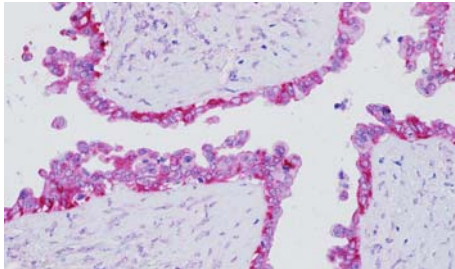
MKP-1 positiv



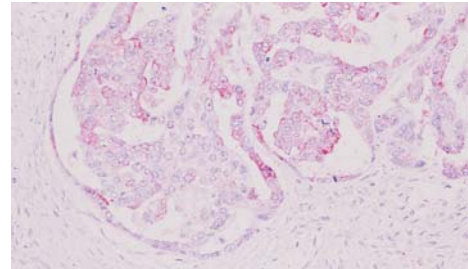
seröses Zystadenom



Klarzellkarzinom

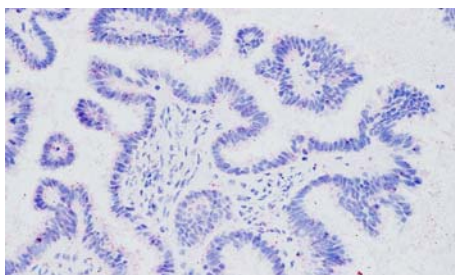


seröser Borderline-Tumor

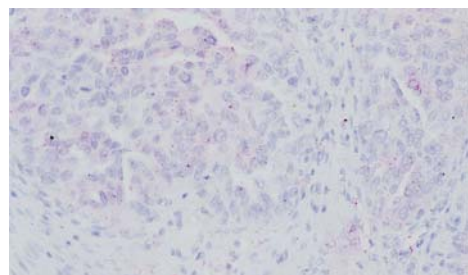


seröses Ovarialkarzinom

MKP-1 negativ



seröser Borderline-Tumor



seröses Ovarialkarzinom

Abbildung 19: MKP-1 Immunhistologie. Exemplarische Abbildung positiver und negativer immunhistologischer Färbungen.

3.4.3 MKP-1 ist in invasiven Karzinomen geringer exprimiert

Insgesamt wurden von 101 Patientinnen Ovarialtumoren, Zystadenome oder normale Ovarien immunhistologisch untersucht. Das Durchschnittsalter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Operation betrug 58 Jahre bei einer Standardabweichung von 12,6 Jahren.

Unter den 66 invasiven primären Ovarialkarzinomen waren 35 (53%) serös, 5 (8%) muzinös, 8 (12%) endometroid, 2 (3%) klarzellig, 1 (1%) transitionalzellig und 15 (23%) undifferenziert.

Die 13 Borderline-Tumoren wurden in 10 Fällen als serös, in 2 als muzinös und in einem Fall als serös-muzinöser Misch tumor diagnostiziert.

Darüber hinaus befanden sich 11 Zystadenome und 11 normale Ovarien in der untersuchten Population.

Die Verteilung der MKP-1-Expression ist in der nachfolgenden Tabelle 6 wiedergegeben:

Tabelle 6: MKP-1-Expression in normalen Ovarien und Tumoren

<u>MKP-1-Expression</u>			
	negativ	positiv	Gesamt
invasive Karzinome	28 (42,4 %)	38 (57,6 %)	66 (100%)
Borderline-Tumore	7 (53,8 %)	6 (46,2 %)	13 (100 %)
Zystadenome	1 (9,1 %)	10 (90,9 %)	11 (100 %)
normale Ovarien	0 (0 %)	11 (100 %)	11 (100 %)

Der MKP-1-Verlust invasiver Karzinome war im Vergleich zur Gesamtheit der übrigen Proben signifikant ($p = 0,011$, χ^2 -Trend-Test).

Ein ähnlicher Anteil MKP-1-negativer Karzinome fand sich bereits auf mRNA-Ebene (vgl. 3.4.1, S. 53), hier waren 5 von 10 (50 %) der invasiven Karzinome MKP-1-negativ.

3.4.4 Univariate Überlebensanalyse

3.4.4.1 Keine Korrelation der MKP-1 mit bekannten Prognosefaktoren

Innerhalb der Gruppe der invasiven Karzinome wurde nachfolgend die MKP-1-Expression mit den wichtigsten klinisch-pathologischen Prognosefaktoren auf Zusammenhänge untersucht (χ^2 -Test und Fisher's Test). Hierbei ergaben sich keine signifikanten Korrelationen mit dem histologischen Typ, Grading, FIGO Stadium, Nodalstatus, Metastasierungsgrad und Patientenalter (nicht gezeigt).

3.4.4.2 MKP-1 hat keinen Einfluß auf das Gesamtüberleben

Zur Erfassung der prognostischen Relevanz standen die Überlebensdaten von 46 der 66 Patienten mit invasivem Karzinom zur Verfügung. Im Gegensatz zu FIGO Stadium, Staging (pT und pM), Klassifizierung als undifferenziertes Karzinom, Silverberg-Grading und Alter zum Diagnose-Zeitpunkt hatte die MKP-1-Expression keinen Einfluß auf das Gesamtüberleben (nicht gezeigt).

3.4.4.3 Kürzeres rezidivfreies Überleben bei MKP-1-positiven Tumoren

In der univariaten Analyse des rezidivfreien Überlebens zeigte sich jedoch die MKP-1-Expression als signifikant mit kürzerem rezidivfreiem Überleben assoziiert ($p = 0,019$; log-rank Test). Ebenfalls signifikant war ein Silverberg-Grading G3 ($p=0,0013$), ein Tumorstaging pT3 ($p=0,016$) sowie ein FIGO-Stadium III-IV ($p=0,028$).

Exemplarisch sind nachfolgend die Kaplan-Meier-Kurven des rezidivfreien Überlebens für MKP-1-Expression und FIGO-Stadium abgebildet:

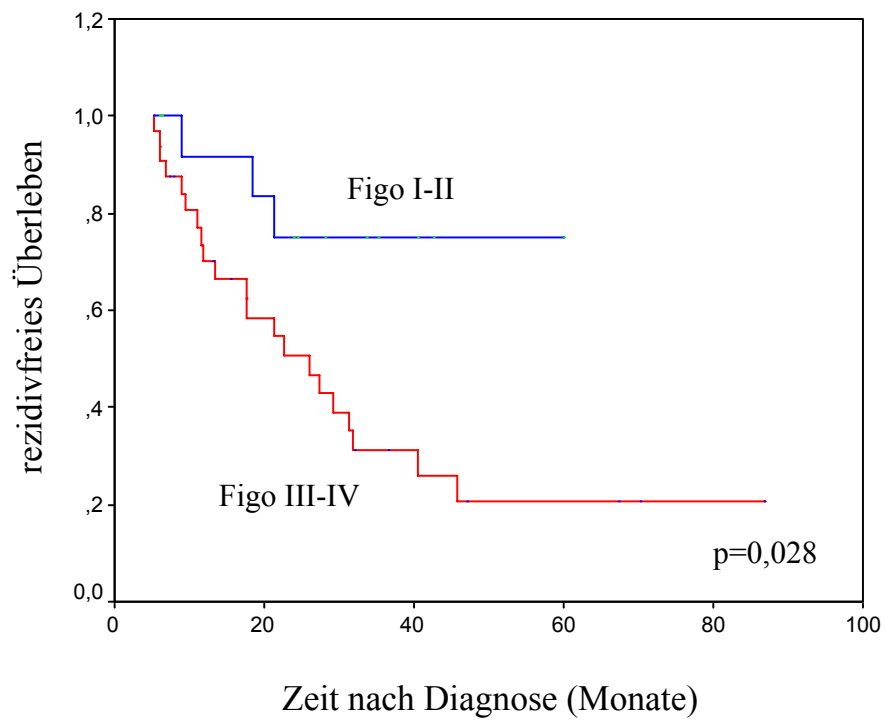
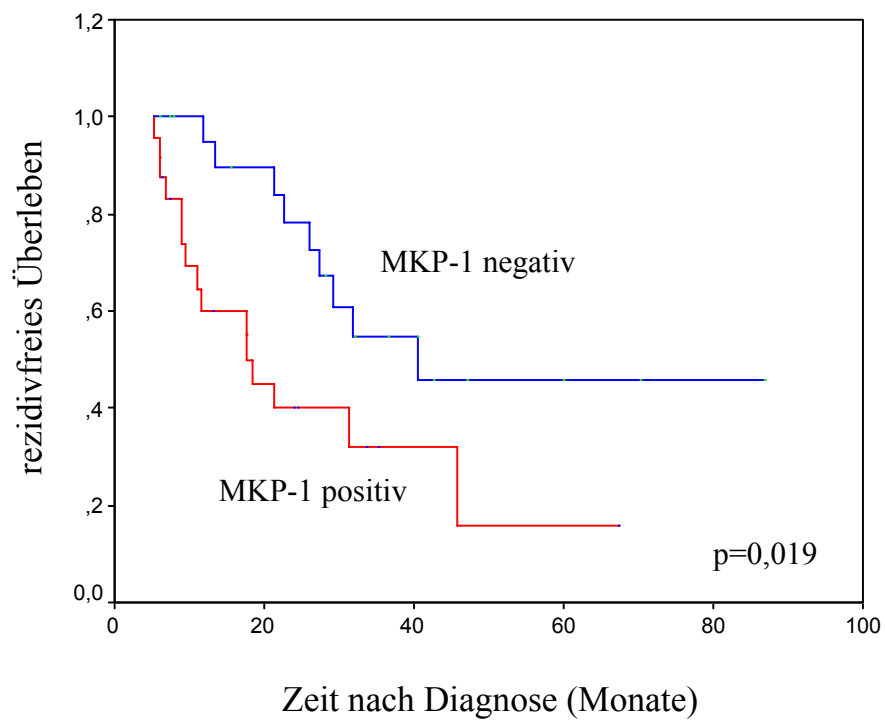


Abbildung 20: Univariate Analysen

3.4.5 Multivariate Überlebensanalyse

Mit Hilfe des „Cox proportional hazards regression model“ wurde in einer exploratorischen multivariaten Überlebensanalyse die Unabhängigkeit der MKP-1-Expression als prognostischer Marker für ein kürzeres rezidivfreies Überleben gezeigt (relatives Risiko (RR) = 4,03; 95%CI = 1,72-9,48; $p = 0,001$). Hierbei wurden alle Parameter berücksichtigt, die in der univariaten Analyse Signifikanz zeigten: FIGO-Stadium III/IV und Silverberg-Grading G3. Das Tumorstaging pT wurde als Bestandteil der FIGO-Klassifikation berücksichtigt.

Neben der MKP-1 war das Silverberg-Grading ein signifikanter unabhängiger Prognoseparameter für das rezidivfreie Überleben. Das FIGO-Stadium erreichte nur eine grenzwertige Signifikanz:

Tabelle 7: Multivariate Überlebensanalyse

	relatives Risiko (RR)	95% CI	p -Wert
<u>MKP-1-Expression</u>			
negativ	1,00		
positiv	4,03	1,72 – 9,48	0,001
<u>FIGO-Stadium</u>			
I-II	1,00		
III-IV	3,481	1,002 – 12,09	0,050
<u>Silverberg-Grading</u>			
G1-G2	1,00		
G3	4,03	1,61 – 10,05	0,003

Die Überlebenskurve in Abhängigkeit von der MKP-1-Expression ist nachfolgend wiedergegeben:

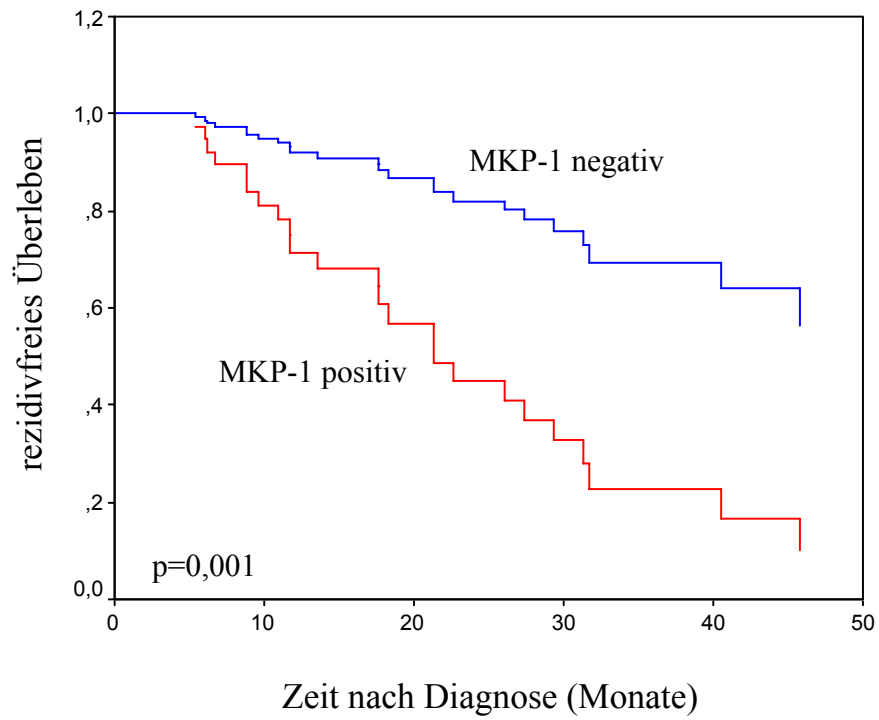


Abbildung 21: Multivariate Analyse

3.5 Phosphatasen-Induktion durch Cisplatin

3.5.1 Induktion der MKP-1 durch Cisplatin in OVCAR-3

Die erheblichen prognostischen Unterschiede in Abhängigkeit von der MKP-1-Expression sind unter Berücksichtigung der primären Therapie zu betrachten. Diese basiert nach radikaler Tumorentfernung typischerweise auf Cisplatin-basierten Chemotherapieprotokollen.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Reaktion der MKP-1 nach Cisplatin-Zugabe in OVCAR-3-Zellen:

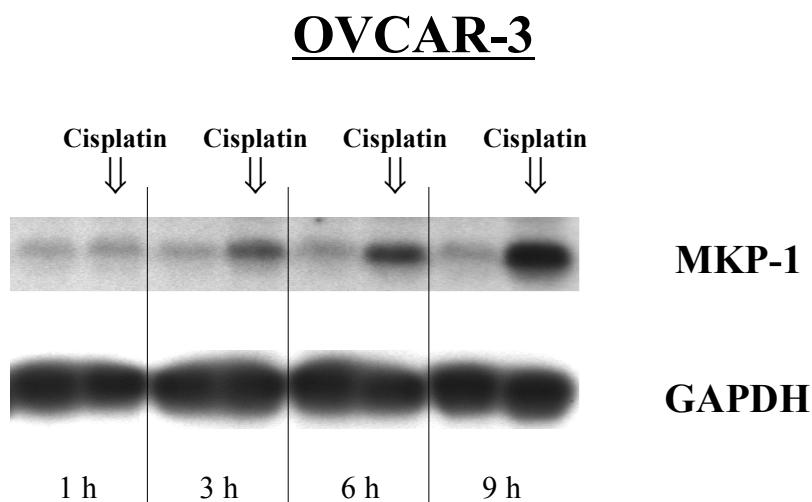


Abbildung 22: MKP-1-Induktion in OVCAR-3 durch Cisplatin
(repräsentative Abbildung aus 2 unabhängigen Versuchen)

Cisplatin bewirkt in OVCAR-3-Zellen eine deutliche Induktion der MKP-1 mit zunehmender Intensität. Nach 24 h ist eine erhebliche Reduktion der GAPDH zu verzeichnen (nicht gezeigt).

3.5.2 Induktion der MKP-3 durch Cisplatin in OVCAR-3

Analog zur Phosphatase MKP-1 wurde auch das Verhalten der MKP-3 unter Cisplatin-Zugabe untersucht:

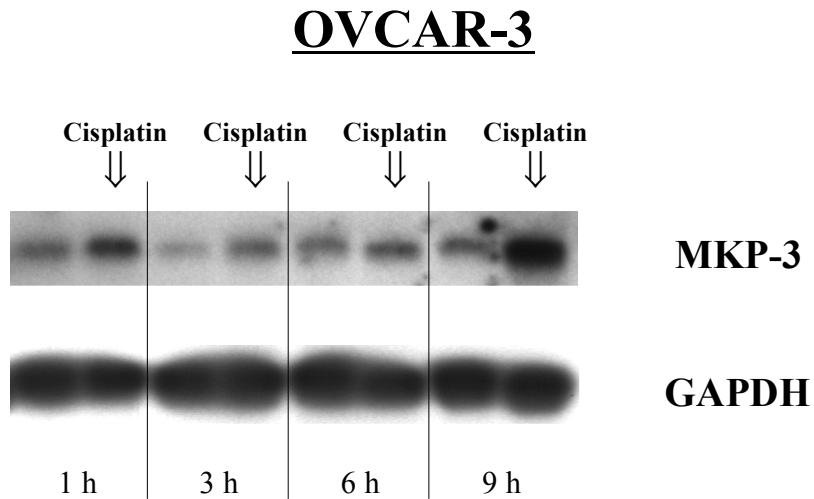


Abbildung 23: MKP-3-Northern Blot. Induktion in OVCAR-3 durch Cisplatin (repräsentative Abbildung aus 2 unabhängigen Versuchen)

Bereits nach 1 h zeigt sich eine deutliche Reaktion der MKP-3 auf Cisplatin, die bis 6 h nach Zugabe etwas abgeschwächt fortbesteht. Nach 9 h steigt die Expression wieder an.

3.5.3 Verhalten der MKP-1 in einer Cisplatin-resistenten Zelllinie

Die Induktion der MKP-1 wurde nachfolgend zwischen der nativen Zelllinie A27/80 sowie der daraus etablierten Cisplatin-resistenten Zelllinie A27/80cis verglichen.

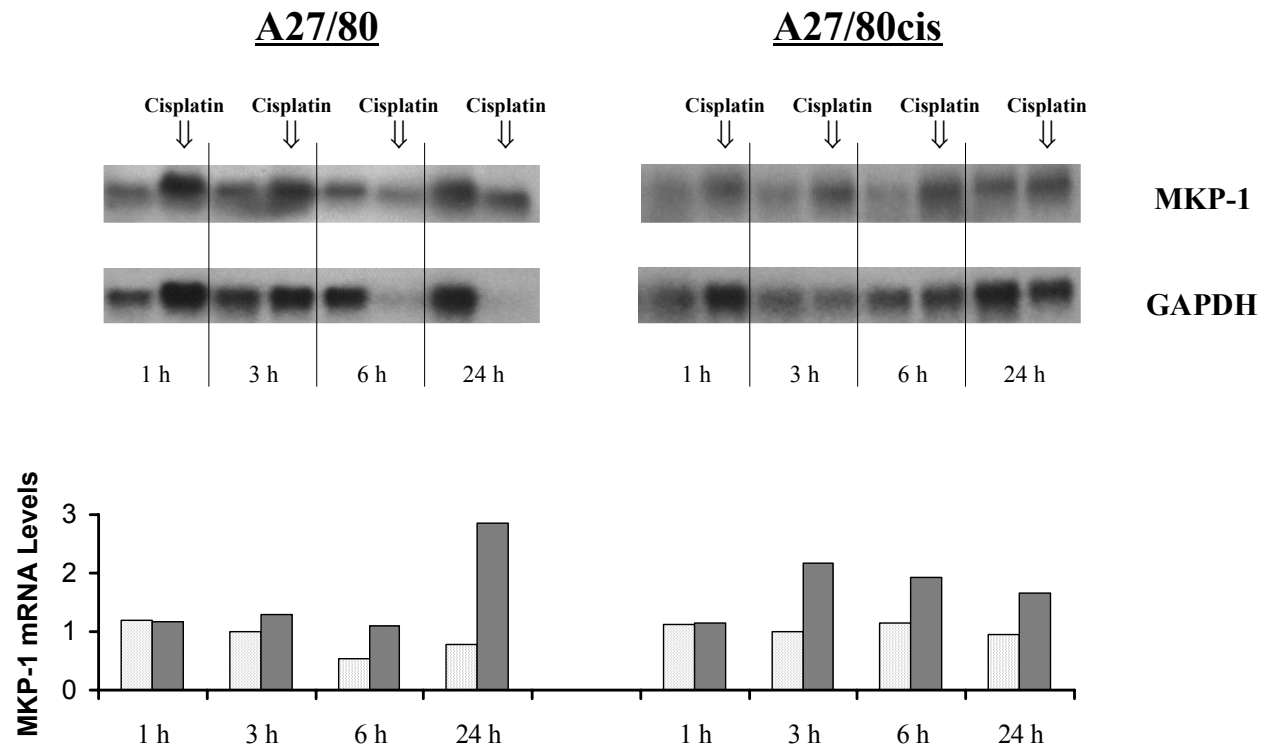


Abbildung 24: MKP-1-Induktion in A27/80 durch Cisplatin

In der nativen Zelllinie A27/80 steigt die MKP-1-Transkription erst nach dem deutlichen Rückgang der GAPDH als Zeichen der zytotoxischen Wirkung des Cisplatins an. Die resistente Zelllinie A27/80cis reagiert bereits 3 h nach Cisplatin-Zugabe mit erhöhter MKP-1-Produktion – ein Abfall der GAPDH läßt sich nicht nachweisen.

4 Diskussion

4.1 MAPK-Phosphatasen sind in verschiedenen Zelllinien nachweisbar

Die PCR-basierte Untersuchung verschiedener Ovarialkarzinomzelllinien auf die Basalexpression von sechs MAPK-Phosphatasen erlaubt aufgrund der hohen Zyklenzahl nur qualitative Aussagen. Mit Ausnahme der MKP-2 konnten alle untersuchten Phosphatasen in allen Zelllinien nachgewiesen werden. In der Literatur werden gelegentlich MAPK-Phosphatasen als Tumorsuppressorgene angesehen.⁷² Mit Ausnahme der MKP-2 in einer Zelllinie konnte dies jedoch nicht bestätigt werden.

4.2 Beeinflussung der Phosphatasenexpression durch Zytokine

4.2.1 Induktion der Phosphatase MKP-1

Bei der Betrachtung der Phosphatasen-Expression nach Zytokin-Zugabe wurde zunächst der MKP-1-Zeitverlauf in der aus unauffälligem ovariellen Oberflächenepithel etablierten Zelllinie HOSE untersucht. Im Vergleich mit den entarteten Zelllinien dürfte ihre Reaktion auf Zytokine dem physiologischen Verhalten am nächsten kommen. In dieser zeigt die Phosphatase MKP-1 nach Zytokinzugabe eine deutliche kurzzeitige Aktivierung, sie dürfte normalerweise für die schnelle, aber zeitlich begrenzte Inaktivierung der MAP-Kinasen nach Zytokin-Aktivierung verantwortlich zu sein.

In den beiden Zelllinien SKOV-3 und OVCAR-3 zeigt die MKP-1 insgesamt ein mit HOSE vergleichbares Verhalten. Bei näherer Betrachtung fällt jedoch in OVCAR-3 nach IL-1 β -Stimulation eine bis zum 24 h-Meßwert signifikant erhöhte MKP-1-Expression auf. Diese verlängerte Aktivität deutet auf eine Fehlregulation innerhalb der aktivierenden Signalkaskaden hin.

Die Zelllinien OAW42 und CAOV-3 weichen erheblich von dem bisher beschriebenen Verhaltensmuster ab. So ist bereits unstimuliert eine deutliche MKP-1-Expression nachweisbar. Nach Zugabe von IL-1 β zeigt keine der beiden Zelllinien eine signifikante Reaktion. Möglicherweise sind Teile des IL-1 β -Signalweges dauerhaft aktiviert und lassen sich durch Zugabe von IL-1 β nicht weiter stimulieren.

Die Zugabe von TNF α führt in beiden Zelllinien zunächst zu dem erwarteten Expressionsanstieg der MKP-1, überraschenderweise kommt es jedoch 3 h nach der Zytokin-Zugabe zu einer hochsignifikanten Reduktion des MKP-1-Levels unter das Basis-Niveau. Dieses in der Literatur bisher nur für die Phosphatase MKP-3 nach Dexamethason-Zugabe beschriebene Phänomen⁶³ ließe sich durch ein negatives Feedback innerhalb des Phosphatasen-aktivierenden Signalweges erklären – denkbar wäre aber auch ein von diesem unabhängiger durch TNF α ausgelöster Mechanismus, der hemmend auf die Expression der MKP-1 einwirkt.

Diese Beobachtung unterstreicht einmal mehr die Komplexität der Signalkaskaden, ohne deren Verständnis eine gezielte Beeinflussung der MAP-Kinasen unter Beachtung der induzierten Wechselwirkungen kaum möglich erscheint.

4.2.2 komplexe Reaktion der Phosphatase MKP-3

Die im Gegensatz zur nukleären MKP-1 im Zytoplasma lokalisierte Phosphatase MKP-3 weist zu großen Teilen ein ähnliches Verhalten auf. So ist die prolongierte Aktivität in OVCAR-3 auch bei der MKP-3 zu finden, diese erstreckt sich sogar bis zum 72 h-Meßwert.

Eine Reduktion der MKP-3-Expression 3 h nach TNF α zeigt sich jedoch nur in OAW42-Zellen. Bemerkenswerterweise geht dieser keine Induktion der MKP-3 voraus, so daß ein Feedback-Mechanismus offensichtlich nicht durch diese Phosphatase selbst ausgelöst wird. Außerdem kann eine Reduktion der MKP-3 unter das Basis-Niveau nicht nur durch dieses Zytokin ausgelöst werden: SKOV-3-Zellen reagieren nach der initialen Induktion durch IL-1 β ebenfalls mit einer Reduktion der MKP-3-Expression. Der zur Hemmung der Phosphatasen führende Mechanismus dürfte demzufolge ebenso komplex sein wie das Aktivierungssystem.

4.3 aktivierende Signalwege

4.3.1 Einfluß der MAPK-Kaskade

Für das Verständnis der großen MAPK-Signalweg-Familie sind neue Erkenntnisse über die Aktivierungsmechanismen der MAPK-Phosphatasen unentbehrlich. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit die Reaktion der Phosphatasen unter dem Einfluß einiger Signalweg-Inhibitoren beobachtet werden.

4.3.1.1 *Beeinflussung der MKP-1*

Zur Untersuchung der aktivierenden Signalwege wurden zwei gebräuchliche Inhibitoren verwendet. Der Inhibitor SB203580 blockiert die wesentlichen Isoformen der p38-MAPK, p38 α und p38 β , bei der verwendeten Konzentration fast vollständig, die Untersuchung weiterer Kinasen ergab unter diesen Bedingungen keine unspezifische Beeinflussung.⁷³ Der Inhibitor PD98059 verhindert die Aktivierung der MEK 1 und 2 und gilt damit als Inhibitor des ERK-Signalweges. Selbst bei Verwendung einer Konzentration von 50 μ M wurde bisher kein Einfluß auf andere Kinasen beschrieben.⁷³

In eigenen Versuche führte der p38-Inhibitor SB203580 zu einer fast vollständigen Blockade der MKP-1-Induktion durch TNF α . Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Bedeutung des p38-Signalweges im Rahmen der Phosphatasen-Regulation. Mit dem Inhibitor PD98059 konnte die durch TNF α ausgelöste Induktion der MKP-1 in zwei Zelllinien deutlich reduziert werden. Die ERK-Kaskade ist also zumindest teilweise an der Regulation der MKP-1 beteiligt, möglicherweise jedoch nicht nur abhängig vom Stimulus sondern auch von dem jeweiligen Zelltyp.

In der Literatur wurden bisher verschiedene, teilweise widersprüchliche Aktivierungswege der MKP-1 diskutiert. So wurde 1996 in Fibroblasten die Induktion über den JNK-Signalweg vermutet⁷⁴. Neben bekannten JNK-aktivierenden extrazellulären Stimuli konnte auch durch konstitutive Expression der vermeintlich JNK-spezifischen MEKK eine MKP-1-Expression erreicht werden. Die dauerhafte Aktivität der zur ERK-Kaskade gehörenden MEK führte hingegen nicht zu einer MKP-1-Induktion.

Im Jahr 1997 wurde erneut gezeigt, daß der ERK-Signalweg nicht zur MKP-1-Induktion ausreicht.²⁹ Kürzlich wurde sogar ein ERK-induzierter Abbau der MKP-1 durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg diskutiert,⁶² der durch den MEK-Inhibitor PD98059 (25µM) in einer Reihe von Säuger-Zelllinien gehemmt werden konnte. Ebenfalls im Jahr 1997 wurde jedoch in der Hamster-Fibroblasten-Zelllinie CCL39 eine Hemmung der MKP-1 durch diesen Inhibitor in einer Konzentration von 10 µM beschrieben.³⁰

Die ursprünglich angenommene direkte Induktion der MKP-1 durch JNK oder p38 wird durch die UV-induzierte JNK- und p38-Aktivierung ohne folgende MKP-1-Induktion widerlegt,³³ auch wenn der p38-Inhibitor SB203580 eine fast vollständige Blockade der MKP-1-Induktion durch TNFα bewirkt (eigene Ergebnisse).

Eine weitere wesentliche Rolle scheinen auch Calcium-Ionen-abhängige Signalwege zu spielen. Einerseits kann durch Calcium-Bindung die MKP-1-Induktion verhindert werden, andererseits ist durch die Zugabe von Calcium-Ionen sogar eine MAPK-unabhängige MKP-1-Induktion möglich.⁷⁵

Insgesamt wird zunehmend deutlich, daß zur Aktivierung dieser Phosphatase mehrere Signale gemeinsam notwendig sind.

4.3.1.2 Beeinflussung der MKP-3

Neben der Induzierbarkeit durch Zytokine in einzelnen Ovarialkarzinomzelllinien konnte die Phosphatase MKP-3 durch die Inhibitoren SB203580 und PD98059 unabhängig von einer parallelen TNFα-Zugabe supprimiert werden. Hierbei zeigte PD98059 den stärkeren Effekt.

Für diese bereits basal exprimierte Phosphatase wurde in der Literatur bisher nur die Induzierbarkeit durch NGF ohne Hinweise auf die zugrundeliegenden Signalwege beschrieben^{45,76}.

4.3.2 Einfluß der Protein Kinase C

Neben Inhibitoren des MAPK-Signalweges wurden auch solche der PKC-Familie verwendet, die an vielen intrazellulären Signalen beteiligt sind. Dabei wird zwischen den klassischen (alpha, α , beta, β und gamma, γ), den neuen (delta, δ , epsilon, ϵ , eta, η , theta, θ und my, μ) sowie den atypischen (zeta, ζ und iota, ι) Protein Kinasen C unterschieden. Die klassischen und neuen Kinasen aktivieren den MAPK-Signalweg über das Protein *raf*, die atypischen aktivieren MEK unabhängig von *raf*.⁷⁷ Für die atypischen PKCs, die auch in die IL-1 β -und TNF α -Signalwege involviert sind, wurde eine wesentliche Rolle in der Steuerung von Zellwachstum und Überleben gezeigt.⁷⁸

Der Inhibitor GF109203X blockiert den Signalweg der konventionellen und neuen PKCs bei einer Konzentration von 1 μ M fast vollständig. Für die atypischen PKCs wird die IC₅₀ mit 6-10 μ M angegeben.⁷⁹

Der Inhibitor Ro-31-8220 unterscheidet sich von GF109203X nur in einer funktionellen Gruppe. Dadurch wird jedoch die Spezifität erheblich verändert. Neben allen Varianten der PKC werden auch die MAPKAPK-1b mit einer IC₅₀ von nur 3nM und weitere Kinasen gehemmt.⁷³ Außerdem scheint Ro-31-8220 den JNK-Signalweg unabhängig von der Protein Kinase C zu aktivieren.⁸⁰

4.3.2.1 Beeinflussung der MKP-1

Die Versuche in zwei Ovarialkarzinomzelllinien zeigen bei bis zu 5 μ M GF109203X keine signifikante Reduktion der MKP-1-Expression nach Zugabe von IL-1 β oder TNF α . Der Inhibitor Ro-31-8220 unterdrückte dagegen schon bei einer Konzentration von 2,5 μ M die Phosphatase MKP-1 fast vollständig. Erst bei einer Steigerung der GF109203X-Konzentration auf 20 μ M war eine leichte Reduktion der Zytokin-induzierten MKP-1-Expression nachweisbar.

In Makrophagen konnte mit 1-5 μ M GF109203X die MKP-1-Induktion durch LPS unterdrückt werden. In Verbindung mit weiteren Versuchen wurde in diesem Fall die PKC ϵ als ursächliche PKC Isoform angenommen.⁸¹ In Fibroblasten können beide Inhibitoren die Induktion der MKP-1 nach Zugabe von PMA blockieren. Die Induktion durch LPA und EGF war jedoch nur durch Ro-31-8220 hemmbar.⁸⁰ Eine weitere Publikation zeigt lediglich eine Verringerung der MKP-1-Induktion durch PMA und FCS bei einer mit 30 μ M recht hohen Konzentration GF109203X.³⁰

Die Regulation der MKP-1 wird somit offensichtlich in Abhängigkeit von Zelltyp und Stimulanz durch verschiedene PKC-Isoformen vermittelt. In den untersuchten Ovarialkarzinomen dürfte die Zytokin-induzierte MKP-1-Expression über atypische PKCs ausgelöst werden, die bereits bei niedrigen Konzentrationen von Ro-31-8220 gehemmt werden, von GF109203X jedoch erst bei höheren Mengen beeinflusst werden. Darüber hinaus ist aufgrund der breiten Spezifität der Inhibitoren jedoch auch ein PKC-unabhängiger Mechanismus für die gezeigten Ergebnisse denkbar.

4.3.2.2 Beeinflussung der MKP-3

In einem weiteren Versuch wurde auch das Verhalten der MKP-3 auf die PKC-Inhibitoren untersucht. Es zeigte sich ebenfalls eine deutliche Supprimierung der IL-1 β -induzierten Phosphatasen-Expression unter Ro-31-8220. Bei 2,5 μ M GF109203X war noch keine signifikante Hemmung der MKP-3 zu erkennen, eine GF-Konzentration von 5 μ M genügte jedoch bereits für eine zunehmende Supprimierung.

Im Vergleich zur Regulation der MKP-1 zeigen sich nur geringe Abweichungen, so daß ähnliche Aktivierungskaskaden beider Phosphatasen anzunehmen sind. Die schon bei etwas niedrigeren GF-Konzentrationen eintretende Reduktion der MKP-3 könnte allerdings als Hinweis auf kleinere Unterschiede zu verstehen sein.

4.3.3 Bistabilität des MAPK-Signalweges

Alle bisherigen Beobachtungen zur Regulation der MAPK-Phosphatasen gingen von einem linearen Aktivierungsmechanismus aus, d.h. es wurde angenommen, daß eine bestimmte Konstellation von aktivierenden und hemmenden Signalen zu einer reproduzierbaren Reaktion der Phosphatasen führt. Im Jahr 2002 wurde jedoch neben der ohnehin schon erheblichen Komplexität der aktivierenden Signalwege ein bistabiles Verhalten des MAPK-Signalweges beschrieben. Dies wurde mit Hilfe eines theoretischen Modells simuliert und experimentell in Maus-Fibroblasten bestätigt.⁸²

Dabei ergibt sich folgender Rückkopplungsmechanismus: Die aktive MAPK aktiviert die cytoplasmatische Phospholipase A₂ (cPLA₂). Diese produziert Arachidonsäure, die wiederum die PKC stimuliert. Diese schließt durch ihre MAPK-aktivierende Wirkung den Regelkreis.

Eine Schlüsselrolle wird dabei der MKP-1-Konzentration zugeschrieben, die sich aus der ursprünglich vorhandenen Menge und der durch den Stimulus induzierten zusammensetzt. Bei einer niedrigen Ausgangsaktivität der Phosphatase führt ein ausreichend starker Stimulus zur Aktivierung des oben beschriebenen Rückkopplungsmechanismus, der MAPK-Signalweg schaltet auf 'high' um. Für die Dimension des Stimulus gibt es dabei einen kritischen Punkt, ab dem der Umschaltmechanismus ausgelöst wird. Ist der Stimulus schwächer, reagiert die MAPK proportional zu diesem und kehrt zügig zu ihrem Ausgangsniveau zurück.

Bei einer hohen Ausgangskonzentration der MKP-1 kann die dauerhafte MAPK-Aktivierung nicht ausgelöst werden, der Signalweg reagiert proportional und kurzfristig auf die aktiverenden Stimuli. Diese Konstellation ist beispielsweise als Folge einer zuvor ausgelösten Umschaltens zum 'high'-Zustand denkbar. Somit ist das Verhalten der MAPK nicht nur von Art, Dauer und Stärke des aktuellen Stimulus abhängig, sondern auch von vorangegangenen Ereignissen.

Dieses zwiespältige Verhalten der MAPK findet sich auch bei der Beeinflussung der MKP-1 wieder. Bei einer dauerhaft aktiven MAPK wird der Abbau der MKP-1 durch das Ubiquitin-Proteasom-System gefördert,⁶² eine Inaktivierung der MAPK somit verhindert. Andererseits führt eine vorübergehende Aktivierung der MAPK zu einer stabilisierenden Phosphorylierung der MKP-1, ohne deren Funktion zu beeinflussen. In diesem Fall wird der Rückgang der MAPK-Aktivität sogar gefördert.

Zusammenfassend ergeben sich innerhalb des komplexen Netzwerks der MAP-Kinasen mehrere Rückkopplungsmechanismen, durch die das System eine Erinnerungsfunktion erhält. Dies muß bei zukünftigen Beobachtungen berücksichtigt werden. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen kann durch die immer gleiche Wachstumsphase vor den Experimenten ein vergleichbarer Ausgangszustand vor den einzelnen Versuchen angenommen werden.

4.4 MKP-1-Expression in primären humanen Ovarialkarzinomen

Untersuchungen auf Zellkulturebene ermöglichen eine Vielzahl von Experimenten zur Aufdeckung und Beeinflussung des MAPK-Signalweges. Sie lassen jedoch kaum Aussagen zu Korrelationen der Phosphatasen-Expression mit Diagnose und Prognose zu. Daher wurde die etablierte Technik des Northern Blots zur Bestimmung der MKP-1-mRNA-Expression in einigen Tumoren verwandt:

4.4.1 Erhebliche Expressionsunterschiede auf mRNA-Ebene

Die Untersuchung der MKP-1-mRNA in 10 Karzinomen und einem Borderline-Tumor zeigte erhebliche Expressionsunterschiede, die Zahl der zur Verfügung stehenden Tumoren genügte jedoch nicht, um Zusammenhänge zwischen MKP-1-Expression und Diagnose zu erkennen. Zur Erweiterung des untersuchten Kollektivs wurde die immunhistologische Färbung der MKP-1 etabliert, mit der eine größere Zahl von Präparaten untersucht wurde.

4.4.2 MKP-1 ist in invasiven Karzinomen geringer exprimiert

Von insgesamt 101 Patientenproben zeigten 11 normale Ovarien eine ausnahmslos positive MKP-1-Expression, in der gleichen Anzahl Zystadenome fand sich lediglich in einem Fall keine Anfärbung. In den Borderline-Tumoren sowie den invasiven Karzinomen war die MKP-1 jedoch bei über 40% nicht nachweisbar. Diese signifikant niedrigere MKP-1-Expression invasiver Karzinome im Vergleich mit normalen Ovarien wurde zuvor auch in zwei Publikationen beschrieben, allerdings mit deutlich geringer Fallzahl.^{83,84} Ein MKP-1-Verlust mit zunehmender Entartung wurde bereits in Prostata-, Kolon- und Blasenkarzinomen gezeigt, in Mammakarzinomen wurde jedoch selbst bei geringer Differenzierung eine hohe MKP-1-Expression gefunden.⁷² In Adenokarzinomen des Magens fand sich sogar eine erhöhte MKP-1 im Vergleich zu normaler Magenmukosa.⁸⁵ Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich jedoch durch unterschiedliche Funktionen der MKP-1 in den verschiedenen Tumorentitäten erklären. Der Verlust der Phosphatase mit zunehmender Entartung begünstigt durch die fehlende Hemmung der p38-MAPK das tumorinduzierte Entzündungsgeschehen und damit das Tumorstadium. Auf der anderen Seite kann eine hohe MKP-1-Expression zur Unterdrückung

von Apoptose führen. Abhängig von den tumorspezifischen Zuständen und Reaktionsmustern der übrigen Signalwege können daher sowohl Unter- als auch Überexpression für den jeweiligen Tumor von Vorteil sein.

4.5 Korrelation der MKP-1-Expression mit der Prognose

4.5.1 Vergleich der MKP-1 mit klinisch-pathologischen Prognosefaktoren

Die unterschiedliche MKP-1-Expression in der Gruppe der invasiven Karzinome wurde mit einer Reihe bewährter klinisch-pathologischer Parameter verglichen. Es ergab sich jedoch kein Zusammenhang mit histologischem Typ, Grading, FIGO-Stadium, Nodalstatus, Metastasierungsgrad oder dem Patientenalter. Die vorliegenden Verteilungen dieser Parameter in dem untersuchten Kollektiv entsprachen etwa dem statistischen Verteilungsmuster in Ovarialkarzinomen, so daß von einem repräsentativen Tumorkollektiv ausgegangen werden kann.

4.5.2 MKP-1 korreliert mit kürzerem rezidivfreiem Überleben

Im Gegensatz zu obigen Prognoseparametern hatte die MKP-1-Expression keinen Einfluß auf das Gesamtüberleben. Es ist somit offensichtlich, daß diese MAPK-Phosphatase keinen Marker für die Gesamtprognose darstellt.

Auffällig ist jedoch die Korrelation von hoher MKP-1-Expression und kürzerem rezidivfreiem Überleben. Eine solche findet sich auch für ein Silverberg-Grading G3, ein Tumorstaging pT3 und ein FIGO-Stadium III-IV. Im Gegensatz zur MKP-1 ist jedoch bei diesen, auch für das Gesamtüberleben signifikanten Prognosemarkern das frühere Auftreten von Rezidiven nicht überraschend.

4.5.3 MKP-1 ist unabhängiger Prognoseparameter

In der multivariaten Analyse unter Berücksichtigung aller zuvor signifikanten Parameter war die MKP-1 ein hochsignifikant unabhängiger Prognosemarker des rezidivfreien Überlebens.

Die deutlichen Prognoseunterschiede MKP-1-positiver und MKP-1-negativer Tumoren bis zum Auftreten eines ersten Rezidivs deuten auf eine wesentliche Rolle der MKP-1 im Rahmen der Primärtherapie hin. Neben der chirurgischen Tumorentfernung beinhaltet diese die gezielte Auslösung des programmierten Zelltodes der entarteten Zellen durch Chemotherapeutika.

4.6 Bedeutung der MKP-1 im Rahmen der Chemotherapie

Obwohl die Chemotherapie in der Behandlung maligner Tumoren vielfach eingesetzt wird und inzwischen eine Vielzahl von Therapieprotokollen für verschiedene Malignome entwickelt wurden, ist der genaue Mechanismus, der zum selektiven Absterben der Tumorzellen führt, für viele der angewandten Substanzen noch unbekannt. Die bisherige Anwendung beruht auf bekannten Angriffspunkten der verwendeten Substanzen, beispielsweise Interaktionen mit der DNA oder Hemmung des Mitosemechanismus, und den Erfahrungen des schließlich resultierenden Zelltodes. Inzwischen gibt es eine Reihe von Publikationen, die die MAPK-Signalwege als kritischen Mechanismus zwischen diesen Ereignissen beschreiben.

4.6.1 Die Bedeutung des MAPK-Signalweges bei der Apoptose

4.6.1.1 JNK und p38 sind mit Apoptose assoziiert

Bereits vor einigen Jahren wurde gezeigt, daß in PC12-Zellen durch die Aktivierung der MAP Kinasen JNK und p38 unter bestimmten Bedingungen Apoptose ausgelöst werden kann.⁸⁶ Die pro-apoptotische Wirkung der JNK wurde später auch in PIN (prostatic intraepithelial neoplasia) und Mamma-Karzinomen beschrieben.^{69,87} Eine JNK-Induktion fand sich weiterhin auch während der Apoptose nach TNF α - oder Cisplatin-Zugabe.⁸⁸ Die Blockade der TNF α -induzierten Apoptose durch p38-Inhibitoren⁸⁹ ist wiederum ein Hinweis auf die wesentliche Rolle der p38-MAPK bei der Entscheidung zwischen Überleben und Zelltod.

4.6.1.2 ERK wirkt anti-apoptotisch

Im Gegensatz zu JNK und p38 wirkt die ERK anti-apoptotisch und bewirkt Proliferation, Differenzierung und Überleben.⁸⁶ Dennoch genügt deren Blockade nicht unmittelbar zur Auslösung von Apoptose.⁹⁰ Sie führt jedoch zu erhöhten Leveln von JNK und p38⁹¹ und sensitiviert beispielsweise promyeloleukämische Zellen für die medikamentös ausgelöste Apoptoseinduktion.⁹² Außerdem wurde gezeigt, daß durch Inhibitoren der ERK-aktivierenden MEK die TNF α -induzierte Apoptose gefördert wird.⁸⁹

Insgesamt wird deutlich, daß die Entscheidung zwischen Apoptose oder Überleben nicht durch die Aktivierung oder Hemmung eines einzelnen Signalweges, sondern durch bestimmte Konstellationen der MAPK-Familie ausgelöst wird. Dies erklärt auch, warum die Apoptose-Induktion durch Überexpression der MEKK1 nicht durch Inhibitoren einzelner Signalwegsmitglieder hemmbar ist.⁹³

4.6.2 Die kritische Rolle der MKP-1 „zwischen Leben und Tod“

Die MKP-1 scheint bei der dynamischen Entstehung der über Apoptose oder Überleben entscheidenden MAPK-Zustände eine wesentliche Rolle zu spielen. So zeigte sich in PIN, daß MKP-1-negative Läsionen eine höhere Apoptose-Rate aufweisen.⁶⁹ Weiterhin finden sich sowohl in Mamma-Karzinomen als auch in PIN erhöhte Aktivitäten der MAP-Kinasen und der MKP-1.^{69,87} Eine Dysregulation der MKP-1 verhindert hier möglicherweise den durch JNK und p38 auszulösenden Zelltod.

Die erhebliche Bedeutung der MKP-1 zeigt sich jedoch besonders im Rahmen der Therapieoptionen maligner Tumoren: In einigen Fällen ist der strahlentherapeutische Therapieansatz wesentlich erfolgreicher als die Chemotherapie. Dieser Vorteil der Bestrahlung könnte auf die ausbleibende MKP-1-Induzierung zurückzuführen sein, die eine prolongierte und damit apoptoseinduzierende JNK-Aktivierung zuläßt.⁹⁴ Für diese These spricht weiterhin, daß in einem experimentellen Ansatz die UV-induzierte Apoptose, die ebenfalls ohne MKP-1-Aktivierung einhergeht, durch konstitutive Expression der MKP-1 blockiert werden konnte.⁹⁵

Umgekehrt konnte in Zellen, die normalerweise resistent gegen TNF α -induzierte Apoptose sind, durch Hemmung der MKP-1 Apoptose ausgelöst werden.⁹⁶

In hochgradig resistenten Leukämie-Zellen wurde die atypische PKC ι (iota) als Mediator anti-apoptotischer Effekte beschrieben⁹⁷. Unter der Annahme, daß die MKP-1 durch atypische Protein Kinasen C aktiviert wird (vgl. Kap. 4.3.2.1, S. 67) könnte sich die MKP-1 auch in diesem Fall als über Apoptose entscheidener Richter erweisen.

4.6.3 Verhalten des MAPK-Signalweges unter Chemotherapeutika

Die Ergebnisse zum Verhalten der MAPK-Phosphatasen zeigen in der Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3 unter einer zytotoxischen Cisplatin-Konzentration einen verzögerten Anstieg der MKP-1 Expression, der sich bis zum Absterben der Zellen kontinuierlich fortsetzt. Der Vergleich der Ovarialkarzinom-Zelllinie A27/80 mit einer daraus etablierten Cisplatin-resistenten Linie ergibt unterschiedliche Zeitverläufe der Phosphatase MKP-1: In der sensitiven Zelllinie steigt die MKP-1 erst verspätet an, der resistenten Zelllinie gelingt es offenbar durch initialen MKP-1-Anstieg, die Apoptose zu verhindern.

In der Literatur sind bereits die Auswirkungen einiger Chemotherapeutika auf die MAPK-Familie beschrieben. So aktivieren Cisplatin und andere Platin-Derivate in einer Reihe von Zelllinien die p38-MAP Kinase, durch Doxorubicin oder Taxol kann dieser Signalweg jedoch nicht aktiviert werden.⁹⁸ In früheren Untersuchungen in der Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV-3 konnte die Aktivierung der p38 durch Cisplatin hingegen nicht gezeigt werden, jedoch eine späte und lang anhaltende Aktivität der ERK und JNK.⁹⁹ Eine Inhibition der ERK durch den Inhibitor PD98059 führte zu einer erhöhten Zytotoxizität von Cisplatin,⁹⁹ eine Blockade der p38-MAP Kinase durch SB203580 bewirkte eine Resistenz.⁹⁸ Dies bestätigt die zuvor beschriebenen Einflüsse der verschiedenen MAPK-Signalwege auf Apoptose und Überleben auch für die Behandlung mit Cisplatin.

Bemerkenswert ist die Auswirkung von Transplatin, welches sich als Isomer nur in der molekularen Struktur von Cisplatin unterscheidet (vgl. Abbildung 25).

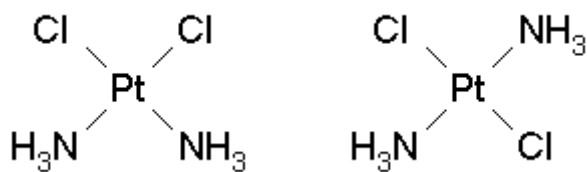


Abbildung 25: molekulare Struktur von Cisplatin und Transplatin

Obwohl Transplatin zumindest eine kurzfristige Aktivierung der p38-MAPK⁹⁸ und JNK¹⁰⁰ bewirkt, hat es selbst auf Zellkulturebene keinen Einfluß auf das Überleben.⁹⁸ Eine klinische Anwendungsmöglichkeit existiert entsprechend nicht. Dennoch bietet sich der Vergleich der beiden Substanzen zur Untersuchung der zugrundeliegenden Effekte an. Offensichtlich ist zur Auslösung der Apoptose der Zeitverlauf der MAPK-Aktivierung von großer Bedeutung. Transplatin verursacht eine starke, kurze und transiente Aktivierung der JNK, nach Cisplatin hingegen findet sich eine langsame, aber andauernde Aktivität, welche mit einem Anstieg der Toxizität einhergeht.¹⁰⁰

Einen deutlichen Unterschied zwischen Cis- und Transplatin findet sich auch bei der Betrachtung der Phosphatase MKP-1: Diese wird nur durch Transplatin deutlich induziert und ist vermutlich durch Inaktivierung der JNK für die unterschiedlichen Zeitverläufe verantwortlich. Die hingegen ausbleibende MKP-1-Induktion nach Cisplatin-Zugabe ermöglicht erst die tödlich-andauernde JNK-Aktivität. Diese Theorie konnte durch Verwendung von Natriumorthovanadat, einem Phosphatasen-Inhibitor, untermauert werden: Natriumorthovanadat führte in Kombination mit Transplatin zu einer verlängerten JNK-Aktivierung, bei der Anwendung zusammen mit Cisplatin genügte bereits ein Zehntel der Cisplatin-Dosis, um den gleichen zytotoxischen Effekt zu erreichen.¹⁰⁰

Zu gleichen Ergebnisse führte schließlich der Vergleich von chemoresistenten Zelllinien mit ihrer Mutterzelllinie. In der humanen Cisplatin-sensiblen Ovarialkarzinomzelllinie 2008 fand sich eine prolongierte Aktivität von JNK und p38-MAP Kinase nach Cisplatin-Zugabe. Die Cisplatin-resistente Zelllinie 2008C13 hingegen zeigte nur eine 1-3 h dauernde, vorübergehende Aktivierung.¹⁰¹ Durch Blockade der beiden Signalwege konnte in der sensitiven Zelllinie die induzierte Apoptose verhindert werden, umgekehrt führte in der resistenten Zelllinie eine Stimulierung von JNK und p38-MAPK zur Sensitivierung.

Aufgrund der ähnlichen Spezifität gegenüber den verschiedenen MAPK-Signalwegen scheint die Phosphatase hVH5 eine ähnliche Bedeutung zu haben.¹⁰² Für die Phosphatase MKP-3 konnte in dieser Arbeit zwar ebenfalls eine komplexe Regulation nachgewiesen werden, aufgrund der hohen Spezifität gegenüber der ERK-MAP Kinase werden die Apoptose-induzierenden Kinasen jedoch nicht beeinflusst.¹⁰²

Insgesamt ergibt sich eine prognostisch relevante Bedeutung der dual-spezifischen Phosphatasen, insbesondere der MKP-1, im Rahmen der Chemotherapie von Ovarialkarzinomen. Neben der Entwicklung spezifischer Inhibitoren zur Optimierung der Chemotherapie sollten alternative Medikamente zur Therapie von Tumoren mit hoher MKP-1-Expression diskutiert werden.

4.7 Ausblick

Ein erster spezifischer MKP-1-Inhibitor wird derzeit von Incyte Inc, Palo Alto, CA, USA in Tierversuchen mit bemerkenswertem Erfolg getestet.¹⁰³ Der Einsatz von Inhibitoren, sowohl experimentell als auch im Rahmen von Tumorthapien, muß jedoch immer unter Beachtung möglicher noch unerkannter Wechselwirkungen geschehen. Weitere möglichst spezifische Möglichkeiten der MKP-1-Blockade, insbesondere die in den letzten Jahren erheblich weiterentwickelte Anwendung von short-interfering RNA (siRNA), sollten daher etabliert werden.

Um bereits die Induktion der Phosphatasen zu verhindern, ist die weitere Untersuchung der aktivierenden Kaskaden notwendig, hier könnte ein Vergleich zwischen Cis- und Transplatin-induzierten Molekülen wegweisend sein.

Schließlich ist das bistabile Verhalten des MAPK-Signalweges in Verbindung mit der MKP-1 unter Therapiebedingungen zu untersuchen, um wiederholte Cisplatin-Gaben zu Zeitpunkten induzierter MKP-1-bedingter Resistenz zu vermeiden.

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Transkriptionsfaktor AP-1
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
ca.	circa
Cdc42	GTPase Cdc42
cDNA	komplementäre DNA
CI	Konfidenzintervall
<i>c-Jun</i>	Transkriptionsfaktor c-Jun
COX-2	Cyclooxygenase 2
DLK	Dual leucine zipper-bearing Kinase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DUSP	Dual-spezifische Phosphatase
E.coli	Escherichia coli
EGF	Epidermal Growth Factor
FCS	foetal calf serum (fötales Kälberserum)
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
g	Gramm
GF	PKC-Inhibitor GF109203X
h	Stunde
H ₂ O	Wasser, reinst
H3	Histon H3
HPV	humanes Papilloma-Virus
IC ₅₀	Inhibitory Concentration (50%)
IL	Interleukin
JIP-1	JNK interacting protein 1
JNK	c-Jun NH2-terminal Kinase

l	Liter
LB	Luria-Bertani
LPA	Lysophosphatidsäure
LPS	Lipopolysaccharide
lt.	laut
LY	PI3-Kinase-Inhibitor LY294002
M3/6	MAPK-Phosphatase M3/6
MAP(K)	Mitogen-Aktivierte Protein (Kinase)
MEK	MAPK-ERK-Kinase
MEKK	MEK Kinase
min	Minuten
mind.	mindestens
μM	Mikromolar
MLK 3	mixed lineage kinase 3
MK2	MAPKAP Kinase 2
MKK, MAP2K	MAP-Kinase Kinase
MKKK, MAP3K	MKK Kinase
MKKKK, MAP4K	MKKK Kinase
MKP	MAPK-Phosphatase
mM	Millimolar
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase 9
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NGF	nerve growth factor
NO	Stickstoffmonoxid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p38	p38 MAPK
p54SAPK	p54 stress-activated protein kinase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion

PD	<i>raf</i> →MKK1-Inhibitor PD98059
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIN	prostatic intraepithelial neoplasia
PKC	Protein Kinase C
PRAK	p38-regulated/activated protein kinase
<i>rac</i>	GTPase <i>rac</i>
<i>raf</i>	<i>raf</i> -Kinase
<i>ras</i>	G-Protein <i>ras</i>
Ro	PKC-Inhibitor Ro-31-8220
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SB	p38-Inhibitor SB203580
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard-Citratlösung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TNF α , TNF	Tumor-Nekrose-Faktor (α)
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (4 β ,9 α ,12 β ,13 α ,20-Pentahydroxytiglia-1,6-dien-3-one 12-tetradecanoate-13-acetat)
U/min	Umdrehungen pro Minute
U0126	MEK-Inhibitor U0126
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vol%	Volumen-Prozent

Literaturverzeichnis

- 1: Greenlee, R.T. et al. (2001): *Cancer statistics*
CA Cancer J.Clin. **51**(1), Seite 15-36
- 2: Blohmer, J.U. und Diel, I. J. (2003): *Gynäkologische Malignome*
Harrisons Innere Medizin, 15. Auflage, Seite 685-691, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin
- 3: Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (2003): *Maligne Ovarialtumoren*
Qualitätssicherung in der Onkologie: Diagnose und Therapie maligner Erkrankungen 2002, Seite 284-297
- 4: Virchow, R. (1863): *Vorlesungen über Pathologie*
Hirschwald, Berlin
- 5: Balkwill, F. und Mantovani, A. (2001): *Inflammation and cancer: back to Virchow ?*
Lancet **357**(9255), Seite 539-545
- 6: Hauptmann, S. (2000): *The role of inflammation in tumor invasion*
Verh.Dtsch.Ges.Pathol. **84**, Seite 77-86
- 7: Dvorak, H.F. (1986): *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*
N.Engl.J.Med. **315**(26), Seite 1650-1659
- 8: Ness, R.B. und Cottreau, C. (1999): *Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer*
J.Natl.Cancer Inst. **91**(17), Seite 1459-1467
- 9: Berger, S. et al. (2000): *Ovarian carcinoma cell lines do not respond to IL-10: sign of an autonomous cytokine production*
Pathology - Research and Practice **196**, Seite 450
- 10: Seger, R. und Krebs, E.G. (1995): *The MAPK signaling cascade*
FASEB J. **9**(9), Seite 726-735
- 11: Arbabi, S. und Maier, R.V. (2002): *Mitogen-activated protein kinases*
Crit.Care Med. **30**(1. Supp), Seite S74-S79
- 12: Chang, L. und Karin, M. (2001): *Mammalian MAP kinase signalling cascades*
Nature **410**(6824), Seite 37-40
- 13: Tibbles, L.A. und Woodgett, J.R. (1999): *The stress-activated protein kinase pathways*
Cell Mol.Life Sci. **55**(10), Seite 1230-1254
- 14: Xiao, Y.Q. et al. (2002): *Cross-talk between ERK and p38 MAPK mediates selective suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming growth factor-beta*
J.Biol.Chem. **277**(17), Seite 14884-14893
- 15: Biocarta (2003)
Webpage <http://www.biocarta.com/genes>

- 16: Garrington, T.P. und Johnson, G.L. (1999): *Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways*
Curr.Opin.Cell Biol. **11**(2), Seite 211-218
- 17: Johnson, G.L. und Lapadat, R. (2002): *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*
Science **298**(5600), Seite 1911-1912
- 18: Lasa, M. et al. (2001): *Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38*
Mol.Cell Biol. **21**(3), Seite 771-780
- 19: Chen, W. et al. (2002): *Stimulus-specific requirements for MAP3 kinases in activating the JNK pathway*
J.Biol.Chem. **277**(51), Seite 49105-49110
- 20: Chen, G. et al. (2000): *The p38 pathway provides negative feedback to Ras proliferative signaling*
J.Biol.Chem. **275**(50), Seite 38973-38980
- 21: Govindarajan, B. et al. (2003): *Malignant Transformation of Melanocytes to Melanoma by Constitutive Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase (MAPKK) Signaling*
J.Biol.Chem. **278**(11), Seite 9790-9795
- 22: Cohen, C. et al. (2002): *Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression*
Clin.Cancer Res. **8**(12), Seite 3728-3733
- 23: Uzgaré, A.R. et al. (2003): *Differential expression and/or activation of P38MAPK, erk1/2, and jnk during the initiation and progression of prostate cancer*
Prostate **55**(2), Seite 128-139
- 24: Choi, K.C. et al. (2003): *Adenosine triphosphate activates mitogen-activated protein kinase in pre-neoplastic and neoplastic ovarian surface epithelial cells*
Biol.Reprod. **68**(1), Seite 309-315
- 25: Hoshino, R. et al. (1999): *Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors*
Oncogene **18**(3), Seite 813-822
- 26: Keyse, S.M. und Emslie, E.A. (1992): *Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase*
Nature **359**(6396), Seite 644-647
- 27: Charles, C.H. et al. (1993): *The growth factor-inducible immediate-early gene 3CH134 encodes a protein-tyrosine-phosphatase*
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **90**(11), Seite 5292-5296
- 28: Keyse, S.M. (1998): *Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity*
Semin.Cell Dev.Biol. **9**(2), Seite 143-152
- 29: Cook, S.J. et al. (1997): *Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression by extracellular signal-related kinase-dependent and Ca²⁺-dependent signal pathways in Rat-1 cells*
J.Biol.Chem. **272**(20), Seite 13309-13319

- 30: Brondello, J.M. et al. (1997): *The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade*
J.Biol.Chem. **272**(2), Seite 1368-1376
- 31: Bhalla, U.S. und Iyengar, R. (1999): *Emergent properties of networks of biological signaling pathways*
Science **283**(5400), Seite 381-387
- 32: Sun, H. et al. (1993): *MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo*
Cell **75**(3), Seite 487-493
- 33: Franklin, C.C. und Kraft, A.S. (1997): *Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells*
J.Biol.Chem. **272**(27), Seite 16917-16923
- 34: Kwak, S.P. et al. (1994): *Isolation and characterization of a human dual specificity protein-tyrosine phosphatase gene*
J.Biol.Chem. **269**(5), Seite 3596-3604
- 35: Emslie, E.A. et al. (1994): *The CL100 gene, which encodes a dual specificity (Tyr/Thr) MAP kinase phosphatase, is highly conserved and maps to human chromosome 5q34*
Hum.Genet. **93**(5), Seite 513-516
- 36: Rohan, P.J. et al. (1993): *PAC-1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase*
Science **259**(5102), Seite 1763-1766
- 37: Martell, K.J. et al. (1994): *Chromosomal localization of four human VHL-like protein-tyrosine phosphatases*
Genomics **22**(2), Seite 462-464
- 38: Ishibashi, T. et al. (1992): *Expression cloning of a human dual-specificity phosphatase*
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **89**(24), Seite 12170-12174
- 39: Kamb, A. et al. (1994): *Localization of the VHR phosphatase gene and its analysis as a candidate for BRCA1*
Genomics **23**(1), Seite 163-167
- 40: Misra-Press, A. et al. (1995): *A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase. Structure, expression, and regulation*
J.Biol.Chem. **270**(24), Seite 14587-14596
- 41: Guan, K.L. und Butch, E. (1995): *Isolation and characterization of a novel dual specific phosphatase, HVH2, which selectively dephosphorylates the mitogen-activated protein kinase*
J.Biol.Chem. **270**(13), Seite 7197-7203
- 42: King, A.G. et al. (1995): *Isolation and characterisation of a uniquely regulated threonine, tyrosine phosphatase (TYP 1) which inactivates ERK2 and p54jnk*
Oncogene **11**(12), Seite 2553-2563
- 43: Smith, A. et al. (1997): *Chromosomal localization of three human dual specificity phosphatase genes (DUSP4, DUSP6, and DUSP7)*
Genomics **42**(3), Seite 524-527

- 44: Ishibashi, T. et al. (1994): *A novel dual specificity phosphatase induced by serum stimulation and heat shock*
J.Biol.Chem. **269**(47), Seite 29897-29902
- 45: Muda, M. et al. (1996): *MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase*
J.Biol.Chem. **271**(8), Seite 4319-4326
- 46: Muda, M. et al. (1996): *The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases*
J.Biol.Chem. **271**(44), Seite 27205-27208
- 47: Groom, L.A. et al. (1996): *Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase*
EMBO J. **15**(14), Seite 3621-3632
- 48: Furukawa, T. et al. (1998): *Genomic analysis of DUSP6, a dual specificity MAP kinase phosphatase, in pancreatic cancer*
Cytogenet.Cell Genet. **82**(3-4), Seite 156-159
- 49: Martell, K.J. et al. (1995): *hVH-5: a protein tyrosine phosphatase abundant in brain that inactivates mitogen-activated protein kinase*
J.Neurochem. **65**(4), Seite 1823-1833
- 50: Nesbit, M.A. et al. (1997): *Genomic organization and chromosomal localization of a member of the MAP kinase phosphatase gene family to human chromosome 11p15.5 and a pseudogene to 10q11.2*
Genomics **42**(2), Seite 284-294
- 51: Muda, M. et al. (1997): *Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4*
J.Biol.Chem. **272**(8), Seite 5141-5151
- 52: Tanoue, T. et al. (1999): *Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5*
J.Biol.Chem. **274**(28), Seite 19949-19956
- 53: Masuda, K. et al. (2000): *Expression and comparative chromosomal mapping of MKP-5 genes DUSP10/Dusp10*
Cytogenet.Cell Genet. **90**(1-2), Seite 71-74
- 54: Li, J. et al. (2001): *Transcriptional induction of MKP-1 in response to stress is associated with histone H3 phosphorylation-acetylation*
Mol.Cell Biol. **21**(23), Seite 8213-8224
- 55: Lasa, M. et al. (2002): *Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38*
Mol.Cell Biol. **22**(22), Seite 7802-7811
- 56: Imasato, A. et al. (2002): *Inhibition of p38 MAPK by glucocorticoids via induction of MAPK phosphatase-1 enhances nontypeable Haemophilus influenzae-induced expression of toll-like receptor 2*
J.Biol.Chem. **277**(49), Seite 47444-47450

- 57: Laderoute, K.R. et al. (1999): *Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression is induced by low oxygen conditions found in solid tumor microenvironments. A candidate MKP for the inactivation of hypoxia-inducible stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal protein kinase activity*
J.Biol.Chem. **274**(18), Seite 12890-12897
- 58: Chu, Y. et al. (1996): *The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation*
J.Biol.Chem. **271**(11), Seite 6497-6501
- 59: Haneda, M. et al. (1999): *Mitogen-activated protein kinase phosphatase: a negative regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade*
Eur.J.Pharmacol. **365**(1), Seite 1-7
- 60: Charles, C.H. et al. (1992): *cDNA sequence of a growth factor-inducible immediate early gene and characterization of its encoded protein*
Oncogene **7**(1), Seite 187-190
- 61: Brondello, J.M. et al. (1999): *Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation*
Science **286**(5449), Seite 2514-2517
- 62: Lin, Y.W. et al. (2003): *ERK1/2 Achieves Sustained Activation by Stimulating MAPK Phosphatase-1 Degradation via the Ubiquitin-proteasome Pathway*
J.Biol.Chem. **278**(24), Seite 21534-21541
- 63: Engelbrecht, Y. et al. (2003): *Glucocorticoids induce rapid up-regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and impair proliferation in human and mouse osteoblast cell lines*
Endocrinology **144**(2), Seite 412-422
- 64: Chen, P. et al. (2001): *Discordance between the binding affinity of mitogen-activated protein kinase subfamily members for MKP-2 and their ability to catalytically activate the phosphatase*
J.Biol.Chem. **276**(31), Seite 29440-29449
- 65: Wellbrock, C. et al. (2002): *Activation of p59(Fyn) leads to melanocyte dedifferentiation by influencing MKP-1-regulated mitogen-activated protein kinase signaling*
J.Biol.Chem. **277**(8), Seite 6443-6454
- 66: Magi-Galluzzi, C. et al. (1997): *Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is overexpressed in prostate cancers and is inversely related to apoptosis*
Lab.Invest. **76**(1), Seite 37-51
- 67: Tsao, S.W. et al. (1995): *Characterization of human ovarian surface epithelial cells immortalized by human papilloma viral oncogenes (HPV-E6E7 ORFs)*
Exp.Cell Res. **218**(2), Seite 499-507
- 68: Lennon, G. et al. (1996): *The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression*
Genomics **33**(1), Seite 151-152
- 69: Magi-Galluzzi, C. et al. (1998): *Mitogen-activated protein kinases and apoptosis in PIN*
Virchows Arch. **432**(5), Seite 407-413

- 70: Sun, H. und Tonks, N.K. (1994): *The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling*
Trends.Biochem.Sci. **19**(11), Seite 480-485
- 71: Kazama, H. und Yonehara, S. (2000): *Oncogenic K-Ras and basic fibroblast growth factor prevent Fas-mediated apoptosis in fibroblasts through activation of mitogen-activated protein kinase*
J.Cell Biol. **148**(3), Seite 557-566
- 72: Loda, M. et al. (1996): *Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the early phases of human epithelial carcinogenesis*
Am.J.Pathol. **149**(5), Seite 1553-1564
- 73: Davies, S.P. et al. (2000): *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors*
Biochem.J. **351**(Pt 1), Seite 95-105
- 74: Bokemeyer, D. et al. (1996): *Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 by the stress-activated protein kinase signaling pathway but not by extracellular signal-regulated kinase in fibroblasts*
J.Biol.Chem. **271**(2), Seite 639-642
- 75: Scimeca, J.C. et al. (1997): *Essential role of calcium in the regulation of MAP kinase phosphatase-1 expression*
Oncogene **15**(6), Seite 717-725
- 76: Mourey, R.J. et al. (1996): *A novel cytoplasmic dual specificity protein tyrosine phosphatase implicated in muscle and neuronal differentiation*
J.Biol.Chem. **271**(7), Seite 3795-3802
- 77: Schonwasser, D.C. et al. (1998): *Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms*
Mol.Cell Biol. **18**(2), Seite 790-798
- 78: Moscat, J. und Diaz-Meco, M.T. (2000): *The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters*
EMBO Rep. **1**(5), Seite 399-403
- 79: Mao, M. et al. (2000): *Inhibition of growth-factor-induced phosphorylation and activation of protein kinase B/Akt by atypical protein kinase C in breast cancer cells*
Biochem.J. **352**(Pt 2), Seite 475-482
- 80: Beltman, J. et al. (1996): *The selective protein kinase C inhibitor, Ro-31-8220, inhibits mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression, induces c-Jun expression, and activates Jun N-terminal kinase*
J.Biol.Chem. **271**(43), Seite 27018-27024
- 81: Valledor, A.F. et al. (2000): *Protein kinase C epsilon is required for the induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages*
J.Immunol. **164**(1), Seite 29-37
- 82: Bhalla, U.S. et al. (2002): *MAP kinase phosphatase as a locus of flexibility in a mitogen-activated protein kinase signaling network*
Science **297**(5583), Seite 1018-1023

- 83: Unoki, M. und Nakamura, Y. (2001): *Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway*
Oncogene **20**(33), Seite 4457-4465
- 84: Ono, K. et al. (2000): *Identification by cDNA microarray of genes involved in ovarian carcinogenesis*
Cancer Res. **60**(18), Seite 5007-5011
- 85: Bang, Y.J. et al. (1998): *Increased MAPK activity and MKP-1 overexpression in human gastric adenocarcinoma*
Biochem.Biophys.Res.Comm. **250**(1), Seite 43-47
- 86: Xia, Z. et al. (1995): *Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis*
Science **270**(5240), Seite 1326-1331
- 87: Wang, H. et al. (2003): *Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer*
Cancer Lett. **191**(2), Seite 229-237
- 88: Low, W. et al. (1999): *JNK activation is not required for Fas-mediated apoptosis*
Oncogene **18**(25), Seite 3737-3741
- 89: Valladares, A. et al. (2000): *p38 mitogen-activated protein kinase mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in rat fetal brown adipocytes*
Endocrinology **141**(12), Seite 4383-4395
- 90: Tran, S.E. et al. (2001): *MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors*
J.Biol.Chem. **276**(19), Seite 16484-16490
- 91: Park, H.J. et al. (2002): *Role of MAP kinases and their cross-talk in TGF-beta1-induced apoptosis in FaO rat hepatoma cell line*
Hepatology **35**(6), Seite 1360-1371
- 92: Antlsperger, D.S. et al. (2003): *Ajoene-induced cell death in human promyeloleukemic cells does not require JNK but is amplified by the inhibition of ERK*
Oncogene **22**(4), Seite 582-589
- 93: Boldt, S. et al. (2003): *The kinase domain of MEKK1 induces apoptosis by dysregulation of MAP kinase pathways*
Exp.Cell Res. **283**(1), Seite 80-90
- 94: Chen, Y.R. et al. (1996): *The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation*
J.Biol.Chem. **271**(50), Seite 31929-31936
- 95: Franklin, C.C. et al. (1998): *Conditional expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1, is cytoprotective against UV-induced apoptosis*
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **95**(6), Seite 3014-3019
- 96: Guo, Y.L. et al. (1998): *Inhibition of the expression of mitogen-activated protein phosphatase-1 potentiates apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha in rat mesangial cells*
J.Biol.Chem. **273**(17), Seite 10362-10366

- 97: Jamieson, L. et al. (1999): *Protein kinase C α activity is necessary for Bcr-Abl-mediated resistance to drug-induced apoptosis*
J.Biol.Chem. **274**(7), Seite 3927-3930
- 98: Losa, J.H. et al. (2003): *Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy*
Oncogene **22**(26), Seite 3998-4006
- 99: Persons, D.L. et al. (1999): *Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin*
Clin.Cancer Res. **5**(5), Seite 1007-1014
- 100: Sanchez-Perez, I. et al. (1998): *Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death*
Oncogene **16**(4), Seite 533-540
- 101: Mansouri, A. et al. (2003): *Sustained Activation of JNK/p38 MAPK Pathways in Response to Cisplatin Leads to Fas Ligand Induction and Cell Death in Ovarian Carcinoma Cells*
J.Biol.Chem. **278**(21), Seite 19245-19256
- 102: Sanchez-Perez, I. et al. (2000): *CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin*
Oncogene **19**(45), Seite 5142-5152
- 103: Pfahl, M. (2003): *Anti-Cancer Activities of MKP-1 and Cdc25 Phosphatase Inhibitors*
Albany Molecular Research: Technical Reports **8**(17), Seite 3-4

Publikationen

Zeitschriftenbeiträge

C. Denkert, W.D. Schmitt, S. Berger, A. Reles, S. Pest, A. Siegert, W. Lichtenegger, M. Dietel, and S. Hauptmann:

Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma

Int J Cancer 2002 Dec 10; 102(5):507-13

A. Siegert, C. Rosenberg, W.D. Schmitt, C. Denkert, and S. Hauptmann:

Nitric oxide of human colorectal adenocarcinoma cell lines promotes tumour cell invasion

Br J Cancer 2002 Apr 22; 86(8):1310-5

Kongreßbeiträge

Vorträge

W.D. Schmitt, C. Denkert, S. Berger, A. Reles, A. Siegert, and S. Hauptmann:

Expression of MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1) in ovarian cancer

XIIth EuroCellPath Course, May 2002, Berlin

W. D. Schmitt, C. Denkert, S. Berger, A. Reles, A. Siegert, and S. Hauptmann:

Expression und Regulation der MAP-kinase phosphatase-1 (MKP-1) im Ovarialkarzinom

86. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, April 2002, Wien

Pathol Res Pract 2002; 198(3):240

Poster

W. D. Schmitt, C. Denkert, and S. Hauptmann:

Expression and Zytokine-mediated Regulation of MAPK-Phosphatases in Ovarian Cancer

18th European Congress of Pathology, European Society of Pathology, September 2001, Berlin

Virchows Arch. 2001 Sep;439(3):339

C. Denkert, W.D. Schmitt, S. Berger, A. Reles, S. Pest, A. Siegert, W. Lichtenegger, M. Dietel, and S. Hauptmann:

Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in human ovarian carcinoma

93rd Annual Meeting, American Association for Cancer Research, April 2002, San Francisco

Proceedings of the AACR 2002 Mar;43:360

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, denen ich dafür sehr dankbar bin. Mein besonderer Dank gilt:

- meinem Doktorvater **Prof. Dr. Steffen Hauptmann** für seinen außergewöhnlich kollegialen Umgang mit seinen Doktoranden und seinem großen Engagement für gemeinsame Projekte
- meinem Betreuer **PD Dr. Carsten Denkert** für die sorgfältige Konzeption dieses Projektes und seine unendliche Geduld beim Beantworten jeder noch so kleinen Frage
- unserem Institutsdirektor **Prof. Dr. Manfred Dietel** für die gute Forschungsinfrastruktur an unserem Institut
- unserer Biologin **Dr. Antje Siegert** und unserer MTA **Ines Koch** für die Einweisung in die Geheimnisse von Zellkultur und Molekularbiologie und so manche Hilfestellung
- allen **Mitdoktoranden, AG-Mitgliedern und Institutsmitarbeitern** für die angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit
- meinem Chemielehrer **Udo Huwig**, der den Forschergeist in mir geweckt und viele Grundlagen geschaffen hat, auf die ich noch heute immer wieder zurückgreife
- meiner Tanzpartnerin **Dr. Tanja Kuhlmann** für viele schöne Tanzstunden als Ausgleich zur Laborarbeit und für so manche wissenschaftliche Diskussion
- meinen Korrekturlesern **Alexandra Stege, Berit Müller** und **Dr. Olaf Schulte-Herbrüggen** für ihre konstruktiven Anmerkungen und stetigen Ermutigungen
- meinen langjährigen Weggefährten **Natalie Inteworn** und **Sebastian Orso**, die so manchen meiner Schritte beeinflußt und auch zur Motivation für dieses Werk beigetragen haben
- meinem Bruder **Dominik Schmitt** für seine Hilfe im Kampf gegen Hard- und Software
- meinen Eltern **Werner und Irmhild Schmitt**, die mir die Freiheit zu Studium und Promotion gaben, mir stets vertraut und mich stets unterstützt haben

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Großmutter **Sieglinde Steinrücke** posthum – sie hat einen Großteil meines Studiums finanziert und immer an mich geglaubt.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbst ohne die Hilfe Dritter verfaßt wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Alle benutzten Hilfsmittel, die Literatur sowie die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften sind vollständig angegeben.

Berlin, den 30. Juni 2004

Wolfgang D. Schmitt

Lebenslauf

10.09.1975 geboren in Saarbrücken

Schulbildung:

September 1982 – Juni 1986 Grundschule in Schmelz
September 1986 – Juni 1995 Johannes-Kepler-Gymnasium Lebach

Zivildienst:

August 1995 – August 1996 Rettungswache Lebach des DRK

Studium:

Oktober 1996 – September 1998 Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
August / September 1998 Ärztliche Vorprüfung
Oktober 1998 – Dezember 2003 Fortsetzung des Studiums der Humanmedizin an der Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin
August 1999 1. Staatsexamen
Oktober 1999 – März 2000 Erhalt eines Forschungsstipendiums der Charité
August 2000 4-wöchiger Sprachkurs in New York, USA
August 2002 2. Staatsexamen
September – Oktober 2003 6-wöchiges Forschungspraktikum am Dept. of Genetics der
University of Pennsylvania, Philadelphia, USA
Dezember 2003 3. Staatsexamen

Beruf:

seit Januar 2004 Arzt im Praktikum am Institut für Pathologie der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Berlin, den 30. Juni 2004

Wolfgang D. Schmitt